Aus der Universitäts-Kinderklinik Marburg an der Lahn
(Direktor: Prof. Dr. F. Linneweh)

Metabolite der Glykolyse und des Citratzyklus sowie energiereiche Phosphate in der Muskulatur bei Kindern mit Dystrophia musculorum progressiva

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Lothar Stengel-Rutkowski
aus Jena

Marburg 1969

Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg

Aus der Universitäts-Kinderklinik Marburg an der Lahn
(Direktor: Prof. Dr. F. Linneweh)

Metabolite der Glykolyse und des Citratzyklus sowie energiereiche Phosphate in der Muskulatur bei Kindern mit Dystrophia musculorum progressiva

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Lothar Stengel-Rutkowski
aus Jena

Marburg 1969

Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 13.11.1969
gedruckt mit Genehmigung der Fakultät
Dekan: Prof.Dr. rer.nat. P.Karlson
Referent: Prof.Dr.med.Friedrich Linneweh
Correferent: Prof.Dr.Dr.H.J.Hohorst

Meiner Mutter

in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

		Seite
Abkürzungen		
1	Einleitung	5
2	Literatur	6
21	Typeneinteilung der progressiven Muskeldystrophie	6
22	Störung im Creatinhaushalt	7
23	Störung im Glucosehaushalt	7
231	Störung der Glucose-Toleranz	7
232	Störung im Glucose-Gesamtumsatz	8
24	Veränderung der Enzymaktivitäten in der Glycolysekette, dem Citratzyklus und der Atmungskette im Muskel	8
241	Untersuchungen der Gesamtglykolyse	8
242	Untersuchungen einzelner Enzyme	9
25	Substrate der Glycolysekette, Citrat und energiereiche Phosphatverbindungen im dystrophen Muskel	17
26	Zur Wahl des Bezugssystems	25
27	Ziel der eigenen Untersuchung	27
3	Untersuchungsgut und Methodik	28
31	Untersuchungsgut	28
311	Patienten	28
312	Normalkollektiv	36
32	Meßmethodik	37
321	Substratmessung	37
3211	Extraktbereitung	37
3212	Bestimmungsmethoden	37
322	Enzymmessung	45
3221	Extraktherstellung	45
3222	Bestimmungsmethoden	46
33	NCN-Bestimmung	47

		Seite
4	Ergebnisse	48
41	Mittelwerte der Ergebnisse	48
411	Substratwerte bezogen auf Frischgewicht	48
412	NCN-Gehalt des Muskelgewebes	54
413	Substratgehalte bezogen auf NCN	55
42	Enzymaktivitäten pro g FG und pro g NCN	57
43	Korrelation der Metabolit- und Enzymgehalte mit den histologischen Befunden	60
431	NCN-Gehalt	60
432	Substratgehalte	61
433	Enzymgehalte	70
44	Zusammenfassung der Ergebnisse	73
5	Diskussion	74
51	Metabolitgehalte bei Reizung des Muskels	74
511	Der Verlust von Glycolyse- und Citratzyclus-metaboliten - ein Artefakt	74
512	Zusammenfassung der Ergebnisse unter Berücksichtigung des Reizzustandes im Normalkollektiv	77
52	Hypothesen über die Ätiologie der DMP in der Literatur	77
521	Störung der Glycolyse	77
522	Störung des Proteinstoffwechsels (Enzymsynthese)	78
523	Störung in der oxydativen Phosphorylierung	78
53	α-GPOx-Verminderung in der dystrophen Muskulatur	79
54	Zusammenhang der α-GPOx-Verminderung mit dem erniedrigten Gehalt an energiereichen Phosphaten	81
6	Zusammenfassung der Arbeit	84
7	Tabellenanhang (Einzelwerte)	85
8	Literaturverzeichnis	90

Verzeichnis der Abkürzungen

AdK = Adenylat-Kinase
ADP = Adenosin-di-Phosphat
Ald = Aldolase
AMP = Adenosin-mono-Phosphat
ATP = Adenosin-tri-Phosphat
BG = Bindegewebe
Cit = Citronensäure
CK = Creatin-Kinase
CL = Citrat-Lyase
CP = Creatin-Phosphat
Cr = Creatin
Cyt-Ox = Cytochrom-Oxydase
DAP = Dihydroxy-Aceton-Phosphat
DMP = Dystrophia musculorum progressiva
EDTA = Äthylen-diamin-tetraessigsäure
Enol = Enolase
FDP = Fructose-1,6 di -Phosphat
FG = Frischgewicht, Feuchtgewicht
GAP = Glycerinaldehyd-Phosphat
GAPDH = Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase
α-GDH = α-Glycerin-Phosphat-Dehydrogenase
α-GP = α-Glycerin-Phosphat
G6P = Glucose-6-Phosphat
G6PDH = Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
α-GPOx = α-Glycerin-Phosphat-Oxydase
GSH = Glutathion, red
HK = Hexokinase
ICDH = Iso-Citrat-Dehydrogenase
Lac = Lactat
LDH = Lactat-Dehydrogenase
Mal = Malat
MDH = Malat-Dehydrogenase
NAD = Nicotinamid-adenin-dinucleotid (=DPN)
NADH = reduziertes " (=DPNH)
NADP = Nicotinamid-adenin-dinucleotid-Phosphat (=TPN)
NADPH = reduziertes " (=TPNH)
NCN = non-collagen-nitrogen

NCP	= non-collagen-protein
NCPN	= non-collagen-protein-nitrogen
OA	= Oxalacetat
Pi	= anorganisches Phosphat
PEP	= Phosphoenolpyruvat
PFK	= Phosphofructo-Kinase
6PGDH	= 6-Phosphogluconsäure-Dehydrogenase
PGJ	= Phosphoglucose-Isomerase
PGK	= Phosphoglycerat-Kinase
PGM	= Phosphoglucose-Mutase
6PGS	= 6-Phosphogluconsäure
PK	= Pyruvat-Kinase
Pyr	= Pyruvat
Rib-5-P	= Ribulose-5-Phosphat
SDH	= Succinat-Dehydrogenase
TIM	= Triose-Isomerase
TRAP	= Triäthanolamin-hydrochlorid-Puffer
UDP	= Uridin-di-Phosphat

1 Einleitung

Bei Patienten mit Dystrophia musculorum progressiva sind bisher vielfältige biochemische Veränderungen gefunden worden, die sich hauptsächlich auf Verminderungen der Enzym-Aktivitäten im Serum oder im erkrankten Muskelgewebe beziehen. Über den Metabolitgehalt des kranken Gewebes ist nur wenig bekannt.
In der vorliegenden Arbeit wird der Gehalt des dystrophen menschlichen Muskels an Substraten der Glycolyse, des Citratzyclus und energiereicher Phosphatverbindungen mit dem gesunder Muskulatur verglichen.
Es wurden an 10 Kindern, die an der bösartigen Duchenne'schen Form der Muskeldystrophie erkrankt sind, Muskelbiopsien vorgenommen, ebenso an 11 muskelgesunden Personen. Außer den angeführten Substraten wurden noch die Enzyme 6-PGDH, SDH und α-GPOx gemessen.

2 Literatur

21 Typeneinteilung der progressiven Muskeldystrophie

Um die in dieser Arbeit vorkommenden Bezeichnungen für die einzelnen DMP-Formen zu verstehen, sei zunächst eine Unterteilung der DMP gegeben. Bekanntlich werden unter der Bezeichnung "progressive Muskeldystrophie" mehrere Erkrankungen zusammengefaßt, denen die myogene Entstehung und somit einige charakteristische Symptome, z.B. ein pathologisches Erregungsmuster im EMG, gemeinsam sind. Man unterscheidet sie, vor allem nach dem Erbgang, wie folgt: (Rotthauwe 62)

Typ	Verlauf	Beginn u. Prognose	Vererbungsmodus
I = Facioscapulo-humeraler Typ	absteigend	spät.Lebens-erwartung kaum herabgesetzt	autosomal-dominant
II = Glieder-Gürtel-Typ	auf- u. absteigend	im früh.Erwachsenenalter.Lebens-erwartung kaum herabgesetzt	autosomal-rezessiv
IIIa = Becken-Gürtel-Typ = Duchenne'scher Typ* bösartige Form	auf-steigend	bis zum 3. Lebensjahr. Tod bis zum 25. Lebensjahr	x-chromosomal-rezessiv
b = gutartige Form	"	2. Lebensjahrzehnt Lebenserwartung kaum herabgesetzt	"

(*nicht zu verwechseln mit der progressiven spinalen Muskeldystrophie Duchenne-Aran.)

22 Störung im Creatinhaushalt

Lange Zeit bestand die Auffassung, das Wesen der DMP liege in einer Störung des Creatinstoffwechsels. Levène (46) stellte fest, daß eine Proteinzufuhr die stets bei diesen Patienten bestehende Creatinurie verstärkt. Beard und Barnes (4) prägten den Ausdruck "diabetes creatinuricus" und meinten, der dystrophe Muskel könne das exogen zugeführte Creatin nicht "halten".

Neuere Untersuchungen spezifizierten diese Anschauung dahingehend, daß das im Urin erscheinende Creatin nicht aus dem Muskel stamme, sondern direkt aus der Leber (5, 9, 25, 58). Dies erklärt auch die verminderte Creatininausscheidung, da dieses im Muskel aus Creatin entsteht. Roche (5) und Schapira (64) diskutieren, ob diese Befunde nicht einfach auf die verminderte Muskelmasse zurückzuführen seien. Im übrigen weist Meldolesi (51) darauf hin, daß auch neurogene Atrophien, ja sogar Infektionskrankheiten, die sich im Muskel manifestieren, eine Creatinurie hervorrufen.

23 Störung im Glucosehaushalt

Es wurden weiterhin verschiedene pathologische Veränderungen im Glucosestoffwechsel gefunden.

231 Glucosetoleranz

Meldolesi (51) berichtet, daß eine parenterale Glucosezufuhr die Creatinurie zurückdrängen könne, weiter, daß der Blutzucker bei den DMP-Patienten erhöht und die Glucosetoleranz pathologisch sei. Jonăsescu (41) vermutet, die erniedrigte Glucosetoleranz gehe auf die Verminderung der glucoseverbrauchenden Muskelmasse zurück.

Wenn Dextrose und Insulin gleichzeitig appliziert werden, steigt der Blutzucker an und fällt nur verzögert wieder ab (Herschberg (29). Blietz (7) diskutiert deswegen eine Zerstörung der Haftstellen des Insulins an der Zellmembran entweder primär, was zu einem Energiemangel in der Zelle führen würde, oder sekundär durch den dystrophischen Prozeß.
Tyler (70) fand jedoch bei DMP-Patienten eine normale Glucosetoleranz.

232 Glucose-Gesamtumsatz

Gegen eine Störung im Zuckerstoffwechsel spricht, daß erblich dystrophe Mäuse C^{14}-Glucose ebenso schnell verstoffwechseln (gemessen als $C^{14}O_2$) wie gesunde Tiere (2).

24 Veränderungen der Enzymaktivitäten in der Glycolysekette, dem Citratcyclus und der Atmungskette im Muskel

Aus den letzten 15 Jahren liegen eine Fülle von Muskelenzymuntersuchungen bei DMP-kranken Tieren und Menschen vor.

241 Untersuchungen der Gesamtglycolyse

Die Gesamtglycolyse im dystrophen Muskel des Menschen soll auf etwa 1/4 der Norm vermindert sein (21, 59, 64, 67, 71). Alle Autoren erwähnen übereinstimmend, daß neurogene Atrophien zu der gleichen Verminderung führen. Sogar eine Inaktivitätsatrophie infolge Tenotomie kann in diesem Sinne wirksam werden (38). Auch bei erblich dystrophen Mäusen wurde dieser Befund bestätigt (14, 15). An Muskelhomogenaten erblich dystropher Hamster fand Lochner (48) hingegen einen erhöhten Glucoseumsatz.

242 Untersuchungen einzelner Enzyme (Abb. 1)

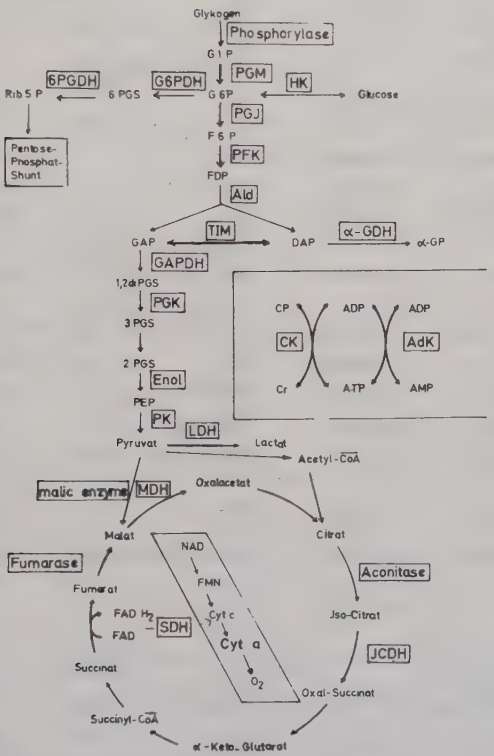


Abb. 1: Enzyme der Glykolyse, des Citratzyklus, der Atmungskette und des Stoffwechsels der energiereichen Phosphate, die in der Literatur bisher gemessen wur den.
Die betreffenden Enzyme sind schwarz umrandet und groß geschrieben.

Tabelle I

Bisher untersuchte Enzyme im Muskel in alphabetischer Reihenfolge bei myogenen und neurogenen Muskelerkrankungen von Mensch und Tier

Enzym	Autor	Spezies	Erkrankung	Methode	Befund
Aconitase	Dreyfus	Mensch	DMP	biochem.	unverändert
Ald	Di Mauro	Mensch	DMP IIIa Neurog.Atrophie	biochem.	erniedrigt
	Dreyfus	Mensch	DMP Neurog.Atrophie	biochem.	erniedrigt
	Gollarz	Mensch	DMP	histochem.	erniedrigt
	Heyck	Mensch	DMP IIIa	biochem.	erniedrigt
	Schapira	Mensch	DMP Neurog.Atrophie	biochem.	erniedrigt
	Tada	Mensch	DMP IIIa	biochem.	unverändert
	Zierler	Maus	Heredit.Dystr.	biochem.	erniedrigt
CK	Kleine	Mensch	DMP	biochem.	erniedrigt
	Heyck	Mensch	DMP IIIa	biochem.	erniedrigt
	Tada	Mensch	DMP IIIa	biochem.	erniedrigt
	Vignos	Mensch	DMP IIIa	biochem.	erniedrigt
Cyt. Ox (=Cyt.a)	Dreyfus	Mensch	DMP	biochem.	unverändert
	Bajusz	Maus	Heredit.Dystr.	histochem.	erhöht in dystr.- erniedrigt in degener. Fasern
Enolase	Heyck	Mensch	DMP IIIa	biochem.	erniedrigt
Fumarase	Dreyfus	Mensch	DMP	biochem.	unverändert
GAPDH	Heyck	Mensch	DMP IIIa	biochem.	erniedrigt
	Coleman	Maus	Heredit.Dystr.	biochem.	erniedrigt
α -GDH	Gollarz	Mensch	DMP	histochem.	erniedrigt
	Coleman	Maus	Heredit.Dystr.	biochem.	erniedrigt
	Mc Caman	Maus	Heredit.Dystr.	biochem.	erniedrigt

Fortsetzung Tabelle I

Enzym	Autor	Spezies	Erkrankung	Methode	Befund
G6PDH	Gollarz	Mensch	DMP	histochem.	erhöht
	Heyck	Mensch	DMP III	biochem.	erhöht
	Canal	Maus	Heredit.Dystr.	biochem.	erhöht
	Coleman	Maus	Heredit.Dystr.	biochem.	erhöht
	Garcia-Buñuel	-	Denervation	biochem.	erhöht
	Mc Caman	Maus	Heredit.Dystr.	biochem.	erhöht
HK	Heyck	Mensch	DMP IIIa	biochem.	zunächst erhöht, später erniedrigt
	Humoller	Ratte	Neurog.Atrophie	biochem.	erhöht
	Mc Caman	Maus	Hered.Atrophie	biochem.	erhöht
ICDH	Gollarz	Mensch	DMP	histochem.	erhöht
	Heyck	Mensch	DMP IIIa	biochem.	zunächst erhöht, später erniedrigt
	Mc Caman	Maus	Heredit.Dystr.	biochem.	erhöht
LDH	Di Mauro	Mensch	DMP IIIa Neurog.Atrophie	biochem.	erniedrigt
	Gollarz	Mensch	DMP	histochem.	erniedrigt
	Heyck	Mensch	DMP IIIa	biochem.	erniedrigt
	Tada	Mensch	DMP IIIa	biochem.	unverändert
	Bajusz	Maus	Heredit.Dystr.	histochem.	erhöht bei dystr.Fasern, erniedr.in degener.Fasern
	Lochner	Hamster	Heredit.Dystr.	biochem.	erhöht
	Mc Caman	Maus	Heredit.Dystr.	biochem.	erniedrigt
Malic-enzyme	Mc Caman	Maus	Heredit.Dystr.	biochem.	unverändert

Fortsetzung Tabelle I

Enzym	Autor	Spezies	Erkrankung	Methode	Befund
MDH	Heyck	Mensch	DMP IIIa	biochem.	zunächst erhöht, später erniedrigt
	Mc Caman	Maus	Heredit.Dystr.	biochem.	unverändert
MK	Kleine	Mensch	DMP	biochem.	erniedrigt
	Heyck	Mensch	DMP IIIa	biochem.	erniedrigt
PFK	Di Mauro	Mensch	DMP IIIa Neurog.Atrophie	biochem.	erniedrigt
6PGDH	Heyck	Mensch	DMP IIIa	biochem.	erhöht
	Canal Coleman	Maus "	Heredit."Dystr.	biochem. "	erhöht "
	Garcia-Buñuel	-	Denervation	biochem.	erhöht
	Mc Caman	Maus	Heredit.Dystr.	biochem.	erhöht
PGJ	Heyck	Mensch	DMP IIIa	biochem.	zunächst erhöht, später erniedrigt
	Schapira	Mensch	DMP	biochem.	erniedrigt
PGK	Heyck	Mensch	DMP IIIa	biochem.	erniedrigt
PGM	Dreyfus	Mensch	DMP	biochem.	erniedrigt
Phosphatasen	Gollarz	Mensch	DMP	histochem.	unterschied
	Vignos	Mensch	DMP IIIa	biochem.	erniedrigt
	Mc Caman	Maus	Heredit.Dystr.	biochem.	erhöht
	Sarkar	Maus	Heredit.Dystr. Vit.-E-Mangel	biochem. "	erhöht "

Fortsetzung Tabelle I

Enzym	Autor	Spezies	Erkrankung	Methode	Befund
Phospho-rylase	Di Mauro	Mensch	DMP IIIa	biochem.	erniedrigt
	Dreyfus	Mensch	DMP	biochem.	erniedrigt
	Hess	Mensch	DMP	biochem.	erniedrigt
	Schapira	Mensch	DMP	biochem.	erniedrigt
	Bajusz	Maus	Heredit.Dystr.	histochem.	erhöht in dystr., erniedrigt in degener.Fasern
	Humoller	Ratte	Neurog.Atrophie	biochem.	erhöht
PK	Heyck	Mensch	DMP IIIa	biochem.	erniedrigt
	Mc Caman	Maus	Heredit.Dystr.	biochem.	unverändert
SDH	Dreyfus	Mensch	DMP	biochem.	erhöht
	Gollarz	Mensch	DMP	histochem.	unverändert
	Vignos	Mensch	DMP IIIa	biochem.	unverändert
	Bajusz	Maus	Heredit.Dystr.	histochem.	erhöht in dystr., erniedrigt in degener. Fasern
CIM	Heyck	Mensch	DMP IIIa	biochem.	zunächst erhöht später erniedrigt
UDP-Glyko-gen-Syn-thase	Di Mauro	Mensch	DMP IIIa Neurog.Atrophie	biochem.	erniedrigt

Erläuterungen zur Tabelle I

Aus der Zusammenstellung wird folgendes deutlich:
Bei den Phosphorylasen finden alle Autoren eine Verminderung der Aktivitäten (19, 21, 30, 64). Hess beschreibt genauer, daß die Verminderung zu Lasten der Phosphorylase b geht, die Phosphorylase a dagegen unverändert gefunden wird.
Humoller (38) berichtet gleiches von neurotomierten Ratten. Bajusz (1) findet jedoch bei histochemischen Untersuchungen einen Phosphorylase-Anstieg in dystrophen Fasern, einen Abfall erst in degenerierten, "ausgebrannten" Fasern.
Die Enzyme der Glycolyse (im cytoplasmatischen Raum lokalisiert) werden von den meisten Autoren erniedrigt gefunden: PGM, PGI und Aldolase zeigen untereinander normale Proportionen, wenn sie auch insgesamt verminderte Aktivitäten haben (21, 64). Ferner machten die Untersuchungen Heycks (31) deutlich, daß die HK, die PGI und die TIM im Verlaufe der Erkrankung zunächst ansteigen, um erst später abzufallen. Heyck deutet dies mit einer stärkeren Bindung dieser Enzyme an Zellstrukturen einerseits und andererseits mit einem größeren Molekulargewicht, in der Vorstellung, daß eine erhöhte Permeabilität der Zellmembranen zuerst Enzyme mit kleiner Molekülgröße diffundieren läßt.
Die Permeabilitätsstörung als Ursache des Enzymverlustes konnte Zierler (75) an der Aldolase nachweisen.
Diesen Befunden widerspricht jedoch Tada (67), der bei der Duchenne'schen Muskeldystrophie keine Veränderungen der Aldolase - und LDH - Aktivität im Muskel feststellen konnte, und Lochner (48), die beim hereditär dystrophen Hamster sogar eine LDH-Erhöhung fand. Ferner beobachteten Mc Caman (49) und Humoller (40) an erblich dystrophen Mäusen bzw. neurotomierten Ratten ein Ansteigen des HK-Gehaltes.

Eine erhöhte Aktivität der G6PDH und 6PGDH wird übereinstimmend von einer Reihe von Autoren erwähnt (12, 15, 27, 28, 31). Garcia-Bunuel findet eine feste Proportionalität dieser Enzymgehalte mit dem einwachsenden collagenen Bindegewebe, und Laudahn weist darauf hin, daß diese Enzyme im Fettgewebe eine 100-fache bzw. 60-fach höhere Aktivität gegenüber dem Muskelgewebe besitzen.

Über Veränderungen bei den Enzymen des Citratcyclus und der Atmungskette sind die Meinungen nicht so einhellig. Aconitase, Cytochrom-Oxydase, Fumarase, MDH und SDH werden von den jeweiligen Untersuchern unverändert gefunden (21, 28, 49, 71), mit folgenden Ausnahmen: Heyck beobachtete zunächst eine Aktivitätszunahme der ICDH und MDH, die erst in späteren Stadien unter die Norm abfallen. Die ICDH wurde ferner sowohl von Gollarz mit histochemischen Methoden bei der menschlichen DMP als auch von Mc Caman mit biochemischen Methoden bei hereditär dystrophen Mäusen erhöht gefunden.
Humoller beschreibt nach Neurotomie eine erniedrigte SDH-Aktivität im Rattenmuskel. Bajusz findet wiederum in den dystrophen Fasern eine verstärkte Aktivität der SDH und Cytochrom-Oxydase, in den "ausgebrannten" Fasern jedoch einen verminderten Gehalt dieser beiden Enzyme.

Die Creatin-Kinase und Adenylat-Kinase wird von allen Untersuchern vermindert gefunden.

Ob diese Änderungen des Muskelenzymmusters für die DMP spezifisch sind, soll dahingestellt bleiben. Zweifel daran erheben sich jedoch, wenn Humoller (40) nach experimenteller Neurotomie bei Ratten ebenfalls eine merkliche Depression der Phosphorylase- und SDH-Aktivität erzeugen konnte, sowie eine deutliche Steigerung des HK-Gehaltes (39).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß bei der DMP insgesamt eine Verminderung der Glycolyse-Enzym-Aktivitäten und der Enzyme, die am Transfer energiereicher Phosphatverbindungen beteiligt sind, gefunden wird, während der Citratcyclus und die Enzyme der Atmungskette, die bisher gemessen wurden, vom Krankheitsprozeß nicht stärker beeinträchtigt zu sein scheinen. Ob eine verminderte Enzymaktivität immer eine Herabsetzung der Substratspiegel bewirkt, wird von Ronzoni (58) bezweifelt. Hierzu müßte sehr wahrscheinlich der Enzymmangel so groß sein, daß nur noch 10 % - 20 % der normalen Aktivität vorhanden wären.
Heyck (31) führt dagegen das auch im dystrophen Muskel unveränderte Creatin-Phosphat/Creatin-Verhältnis an. Trotz des nachgewiesenen CK-Mangels im kranken Muskel werde noch alles anfallende Creatin phosphoryliert. Bisher liegen noch zu wenige und vor allem widersprüchliche Untersuchungen über Metabolitgehalte im Muskel von DMP-Patienten vor, als daß diese Frage eindeutig beantwortet werden könnte.

25 Substrat der Glycolysekette, Citrat- und energiereiche Phosphatverbindungen im dystrophen Muskel

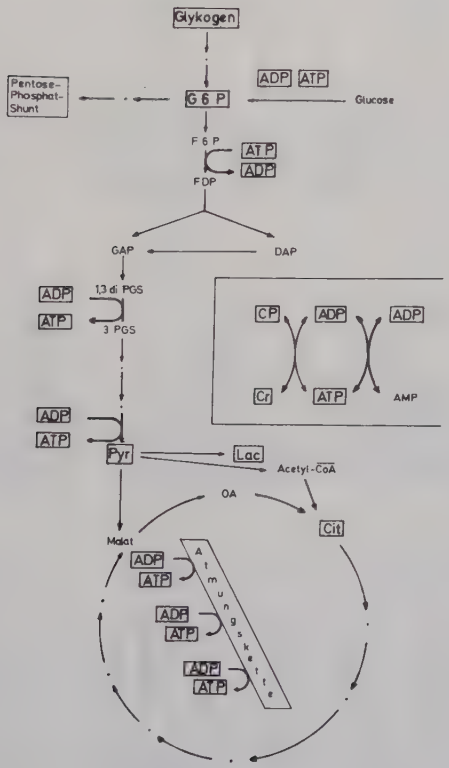


Abb. 2: Metabolite der Glykolyse und energiereiche Phosphate, die in der Literatur bisher untersucht wurden. (schwarz umrandet und groß geschrieben)

Tabelle II

bisherige Substratbefunde mit biochemischen Methoden

Substrat	Autor	Spezies	Zahl d. Stichpr.	Erkrankung	Stadium	Muskel	Narkose	Befund i.%d.Norm	Bezugs-system
ADP	Ronzoni(1958)	Mensch	16	DMP	-	Tric.surae	Lokalanästh.	70%	NCN
				Myoton.Dystr.		Quadr.fem.	"	90%	"
	Vignos(1963)	Mensch	12	DMP IIIa	1L,10M,1S	Rect.abd.	Narkose	unveränd.	NCN
			10	DMP I,II	-	"	"	unveränd.	"
			10	Neur.Atroph.	-	"	"	unveränd.	"
	Lochner(1967)	Hamster	--	Hered.Dystr.	-	Diaphragma	-	unveränd.	NCPN
						Obl.ext.abd.	-	unveränd.	"
						Bic.fem.	-	unveränd.	"
AMP	Lochner(1967)	Hamster	--	Hered.Dystr.	-	Diaphragma	-	75%	NCPN
						Obl.ext.abd.	-	unveränd.	"
						Bic.fem.	-	85%	"
ATP	Nevin(1934)	Mensch	2	DMP,pseudohy.	-	Tric,surae	Lokalanästh.	30%	FG
						Infraspin.			
	Debré(1936)	Mensch	3	Myopathie	-	Tric.surae	Lokalanästh.	30-50%	FG
	Reinhold(1938)	Mensch	12	DMP	L	Vast.lat.	"	unveränd.	Fett-
				"	M	"	"	40%	freie
				"	S	"	"	20%	Muskel-
			16	Polymyositis Amyotr.Lat.Skl.		"	"	ähnl.Wertemasse	
ATP	Humoller(1951)	Ratte	--	Neurotomie	-	Tric.surae	Narkose	65%	FG
	Bonetti(1954)	Mensch	5	DMP	-	Vast.lat.	Lokalanästh.	30%	FG
								50%	NCN
	Ronzoni(1958)	Mensch	16	DMP	-	Tric.surae	Lokalanästh.	60%	NCP
			1	Myoton.Dystr.	-	Quadr.fem.	"	unveränd.	"

Legende: * = nicht signifikant, L = leichte, M = mittelschwere, S = schwere Stadien.

Fortsetzung Tabelle II

Substrat	Autor	Spezies	Zahl d. Stichpr.	Erkrankung	Stadium	Muskel	Narkose	Befund i.%d.Norm	Bezugs-system
ATP (Fortsetz.)	Vignos(1963)	Mensch	12	DMP IIIa	1L,10M,1S	Rect.abd.	Narkose	70%	NCN
			10	DMP I,II	-	"	"	90%	"
			10	Neur.Atroph.	-	"	"	70%	"
	Sarkar(1964)	Maus + Kaninchen	--	Hered.Dystr. + Vit.E.Mangel	M - S	-	-	70-50% je nach Schw.	FG
	Lochner(1967)	Hamster	--	Hered.Dystr.	-	Diaphragma	-	unveränd.	NCPN
						Obl.ext.abd.	-	unveränd.	"
						Bic.fem.	-	85%	"
	Tada(1961)	Mensch	2	DMP IIIa	L	Tric.surae	Lokalanästh.	unveränd.	Prot-N
Citrat	Taussky(1962)	Maus	--	Hered.Dystr. + Vit.E.Mangel	-	-	-	260%	FG
	Niebrój-Dobosz (1965)	Mensch	10	DMP	-	-	Lokalanästh.	170%	NCN
Creatin-P	Nevin(1934)	Mensch	2	DMP,pseudohyp.	M-S	Tric.surae Infraspin.	Lokalanästh.	40%	FG
	Debré(1936)	Mensch	3	Myopathie	-	Tric.surae	Lokalanästh.	20%	FG
	Collazo(1936)	Mensch	5	DMP IIIa	M-S	Deltoideus	Lokalanästh.	60%	FG
	Reinhold(1938)	Mensch	12	DMP	L	Vast.lat.	-	95%	Fett-freie Muskel-masse
				"	M	"	"	25%	
				"	S	"	"	15%	
	Humoller(1951)	Ratte	--	Neurotomie	-	Tric.surae	Narkose	65%	FG

Fortsetzung Tabelle II

Substrat	Autor	Spezies	Zahl d. Stichpr.	Erkrankung	Stadium	Muskel	Narkose	Befund i.%d.Norm	Bezugs-system
Creatin-P (Fortsetz.)	Bonetti(1954)	Mensch	5	DMP	-	Vast.lat.	Lokalanästh.	unveränd.	FG NCN
	Ronzoni(1958)	Mensch	16	DMP	-	Tric.surae	Lokalanästh.	35%	NCN
			1	Myoton.Dystr.	-	"	"	unveränd.	
	Tada(1961)	Mensch	2	DMP IIIa	L	Tric.surae	Lokalanästh.	50%	Prot-N
	Vignos(1963)	Mensch	12	DMP IIIa	1L,10M,1S	Rect.abd.	Narkose	45%	NCN
				DMP I,II	-	"	"	80%	"
				Neur.Atr.	-	"	"	75%	"
	Sarkar(1964)	Maus + Kaninchen	--	Vit.E-Mangel + Hered.Dystr.	M - S	-	-	65%	FG
	Lochner(1967)	Hamster	--	Hered.Dystr.	-	Diaphragma	-	113%*	NCPN
						Obl.ext.abd.	-	80%*	"
						Bic.fem.	-	117%	"
Creatin	Vignos(1963)	Mensch	12	DMP IIIa	1L,10M,1S	Rect.abd.	Narkose	85%	NCN
			10	DMP I,II	-	"	"	85%	"
			10	Neur.Atr.	-	"	"	70%	"
	Kandutsch(1958) et al.	Maus	-	Hered.Dystr.	-	-	-	80%	FG
Glycogen	Debré(1936)	Mensch	3	Myopathie	?	Tric.surae	Lokalanästh.	unveränd.	FG
	Collazo(1936)	Mensch	5	DMP IIIa	M - S	Deltoideus	Lokalanästh.	60%	FG
	Humoller(1951)	Ratte	--	Neurotomie	-	Tric.surae	Narkose	50%	FG

Fortsetzung Tabelle II

Substrat	Autor	Spezies	Zahl d. Stichpr.	Erkrankung	Stadium	Muskel	Narkose	Befund i.%d.Norm	Bezugs-system
Glycogen (Fortsetz.)	Erbslöh(1953)	Mensch	1	DMP IIIa	S	Tib.ant.	Evipan-R.	15-20%	FG
	Tada(1961)	Mensch	2	DMP IIIa	L	Tric.surae	Lokalanästh.	unveränd.	Protein-N
	Vignos(1963)	Mensch	10	DMP IIIa	1L,8M,1S	Rect.abd.	Narkose	40%	NCN
		"	10	DMP I,II	-	"	"	65%	NCN
		"	10	Neur.Atr.	-	"	"	60%	NCN
	Hess(1965)	Mensch	3	DMP IIIa		Tric,surae	Narkose	60%	NCN
	Duma(1967)	Mensch	10	DMP	M - S			65%	FG
		"	7	Neur.Atr.	-			20%	FG
		"	3	Polymyositis	-			50%	FG
	Lochner(1967)	Hamster	--	Hered.Dystr.	-	Diaphragma	-	unveränd.	NCPN
		"	--	m, "	-	Obliq.ext. abdom.	-	unveränd.	"
		"	--	"	-	Biceps fem.	-	unveränd.	"
G6P	Fink(1961)	Maus	-	Hered.Dystr.	-	-	-	erniedr.	-
	Hess(1965)	Mensch	4	DMP IIIa	1L,3S	Tric.surae	Narkose	unveränd.	NCN
Lactat	Debré(1936)	Mensch	3	Myopathie	-	Tric.surae	Lokalanästh.	unveränd.	FG
	Collazo(1936)	Mensch	5	DMP IIIa	M - S	Deltoideus	Lokalanästh.	unveränd.	FG
	Hess(1965)	Mensch	4	DMP IIIa	1L,3S	Tric,surae	Narkose	200%	NCN
Pyruvat	Niebrój-Dobosz (1965)	Mensch	10	DMP	-	-	Lokalanästh.	130%*	NCN

Erläuterungen zur Tabelle II

Bisher sind relativ wenige Metabolite der Glycolyse gemessen worden. 1936 untersuchte Debré (17) den Muskelglycogengehalt myopathischer Patienten, konnte aber keine Abweichung zu den an Tieren gewonnenen Normalwerten feststellen, ebenso in letzter Zeit Tada (67) bei Kindern mit DMP vom Typ IIIa und Lochner (48) bei erblich dystrophen syrischen Goldhamstern.

Die Mehrzahl der Autoren fand hingegen einen erniedrigten Muskel-Glycogengehalt bei der DMP (16, 22, 23, 30 72). Dabei spielt es keine Rolle, ob die einzelnen Untersucher ihre Ergebnisse auf Feuchtgewicht bezogen, oder, um das im dystrophen Muskel mit enthaltene Fett- und Bindegewebe zu berücksichtigen, ein anderes Bezugssystem wählten. Ferner wurde diese Verminderung auch bei anderen, den Muskel in Mitleidenschaft ziehenden pathologischen Zuständen gefunden, so bei neurogener Atrophie und Polymyositis. Humoller (38) konnte diesen Befund sogar nach experimenteller Neurotomie an Ratten erheben, ja auch nach reiner Inaktivitätsatrophie infolge Tenotomie.
Bajusz (1) hingegen beobachtete mit histochemischen Methoden bei dystrophen Mäusen eine Zunahme des Muskelglycogengehaltes.

Auch bei anderen Metaboliten der Glycolyse sind die Ergebnisse nicht eindeutig. Während Fink (24) eine Glucose-6-P-Erniedrigung im Muskel erblich dystropher Mäuse fand, beobachtete Hess (30) bei Kindern mit DMP IIIa einen normalen G6P-Gehalt.

Das Pyruvat wurde von Niebroj-Dobosz (54) bei 10 Fällen nicht näher klassifizierter DMP leicht erhöht gefunden, jedoch wegen der großen Streuung der Meßwerte ist diese Erhöhung nicht signifikant.

Der Lactat-Gehalt ist nach Hess, der vier Fälle von DMP IIIa untersuchte, ebenfalls erhöht (30). Debré (17) und Collazo (16) konnten dies jedoch nicht bestätigen.

Als einziges Substrat des Cytratcyclus wurde bisher das Citrat gemessen. Hier berichtet sowohl Taussky (69) über eine Erhöhung bei Mäusen mit Vitamin-E-Mangel, als auch Niebrój-Dobosz (54) bei menschlicher DMP.

Hinsichtlich des ATP-Gehaltes des dystrophen Muskels besteht weitgehende Übereinstimmung.
Nur Tada (67) maß bei Kindern mit Duchenne'scher Muskeldystrophie und Lochner (48) bei Hamstern mit hereditärer Dystrophie normale ATP-Gehalte. Allerdings beobachtete auch Lochner am M.biceps femoris einen leichten ATP-Abfall. Bei allen anderen Autoren (8, 16, 17, 53, 57, 60, 72) war jedoch der ATP-Gehalt bei der menschlichen DMP niedriger als normal. Bei Ratte, Maus und Kaninchen, hier sowohl bei hereditärer Muskeldystrophie als auch nach Vitamin-E-Mangel-Diät und Neurotomie wurde der gleiche Befund erhoben (38, 63).

Der CP-Gehalt des Muskels ist nach Tada (67) vermindert, während Lochner (48) teilweise eine Vermehrung dieses Metaboliten beobachtete.
Es sei darauf hingewiesen, daß sich nach Reinhold (57) der ATP- und CP-Abfall in den leichteren Fällen nicht bemerkbar macht.

Die ADP- und AMP-Gehalte scheinen vom dystrophen Prozeß weniger berührt zu sein (48, 49, 72).
Ebenso erleidet das Creatin nur einen geringgradigen Abfall (43, 72).

Zusammenfassend kann nach den Befunden der Literatur gesagt werden, daß, im Gegensatz zum Glycolyse-Enzymmuster im dystrophen Muskel, über Metabolitgehalte nur wenige und oft widersprüchliche Mitteilungen vorliegen. Etwas größer ist die Zahl der Arbeiten über die Hauptenergieträger der Muskelarbeit, Creatin-Phosphat und ATP. Diese beiden Substrate werden in der Muskulatur dystropher Individuen als vermindert angesehen. Jedoch sind auch hier die Befunde für die DMP nicht spezifisch - wenn auch meist am ausgeprägtesten - sondern bei anderen Muskelerkrankungen ebenso vorhanden.

26 Zur Wahl des Bezugssystems

Die Wahl einer geeigneten Bezugsgröße stellte auch bei dieser Untersuchung ein besonderes Problem dar (Vergleiche Dreyfus (20)).
Meist werden bei Gewebsuntersuchungen die gemessenen Werte pro Gramm Feuchtigkeit angegeben, unter der Voraussetzung, daß das Gewebe von Stichprobe zu Stichprobe, im untersuchten Kollektiv wie im Normalkollektiv, einheitlich zusammengesetzt ist. Unglücklicherweise werden jedoch im Verlaufe der Muskeldystrophie die untergegangenen Muskelfasern durch Fett- und Bindegewebe ersetzt. Wird zum Beispiel in einem Gramm dystrophen Muskels zweidrittel der ATP-Menge, die gewöhnlich in gesundem Muskel vorhanden ist, gefunden, so kann dies allein durch eine entsprechende Vermehrung des Fett- und Bindegewebes bedingt sein. Der ATP-Gehalt der verbliebenen Muskelmasse würde dann der Norm entsprechen. Die ideale Bezugsgröße wäre die einzelne Muskelfaser. Die Methoden der Zellzählung am histologischen Präparat sind bisher jedoch entweder zu zeitraubend, oder recht ungenau.
Es galt eine Methode zu finden, die den Anteil des noch vorhandenen Muskelgewebes - oder aber den des Ersatzgewebes erfaßt.
Reinhold (57) bezog seine Ergebnisse auf fettfreie Trockenmasse, wobei der zunehmende Collagengehalt unberücksichtigt bleibt. Dreyfus (20) schlägt eine Myosinbestimmung vor, die jedoch technisch schwierig und wegen des unbestimmten Molekulargewichtes des Myosins zweifelhaft ist. Er erwägt ferner die Bestimmung des nicht Hb-gebundenen Eisens, womit vor allem das Myoglobin erfaßt würde. Dieses bleibt jedoch im Laufe der DMP in der Muskelfaser nicht konstant, wahrscheinlich wegen des geringen Molekulargewichtes von ca. 17 000. Seit der

Untersuchung von Lilienthal (47) benutzen die meisten Autoren, zum Teil in Modifikationen, das NCN (non-collagen-nitrogen) als Bezugssystem (Siehe Tabelle II). Heyck (31) lehnte bei seinen Enzymuntersuchungen dieses System ab, da verschiedene Hauptkettenenzyme im Bindegewebe merkliche Aktivitäten besitzen (Delbrück (18)). Er schlägt als annähernd sichere Beurteilungsmöglichkeit Frischgewicht als Bezugssystem und zusätzlich eine histologische Durchmusterung des Präparates vor oder das von ihm gewählte Bezugssystem Extraktprotein.

27 Ziel der eigenen Untersuchung

In vorliegender Arbeit wird versucht, an geeigneten Patienten der Marburger Universitäts-Kinderklinik, die an der Duchenne'schen, x-rezessiv-vererbten Form der Dystrophia musculorum progressiva erkrankt sind, die Befunde obengenannter Autoren zu überprüfen. Es galt Anhaltspunkte dafür zu finden, ob sich die von vielen Autoren beobachtete Depression der Muskel-Enzym-Aktivitäten limitierend auf die Glycolyse, den Citratcyclus und den Stoffwechsel der energiereichen Phosphate auswirkt.
In Abb. 3 sind in einem Stoffwechselschema die gemessenen Substrate dargestellt.

Die eigenen Ergebnisse wurden sowohl in Mol pro Gramm Frischgewicht als auch in Mol pro Gramm NCN ausgedrückt. Zusätzlich wurde versucht, mit der Bestimmung der α-GPOx, die nach Kadenbach im Muskel in etwa 10-facher Konzentration gegenüber anderen Gewebe vorkommt, eine Bezugsgröße für das noch erhaltene Muskelgewebe zu gewinnen. Die -GPOx sollte als streng strukturgebundenes Enzym des mitochondrialen Raumes (10) erst spät der dystrophen Muskelzelle verloren gehen (31).
(Allerdings zeigen die elektronenmikroskopischen Aufnahmen bei einem Patienten (s.S.31) bereits einen weitgehenden Schwund der Mitochondrien im Muskelgewebe. Es ist jedoch fraglich, ob dieser Befund für das Patientenkollektiv repräsentativ ist, da die SDH, ein anderes Mitochondrienenzym, nicht in dem Maße verringert ist, wie die elektronenoptischen Befunde vermuten lassen.) (s.S.)
Weiterhin wurde die 6-PGDH als Parameter für das Anwachsen des Fettgewebes gemessen. Dieses Enzym zeigt nach Angaben von Laudahn im Fettgewebe eine beträchtliche Aktivität, während sie im Muskelgewebe praktisch nur durch die Verunreinigung mit Erythrozyten gemessen werden kann.
Schließlich wurde der Anteil der Muskelfasern an der Gewebsprobe anhand von histologischen Präparaten geschätzt.

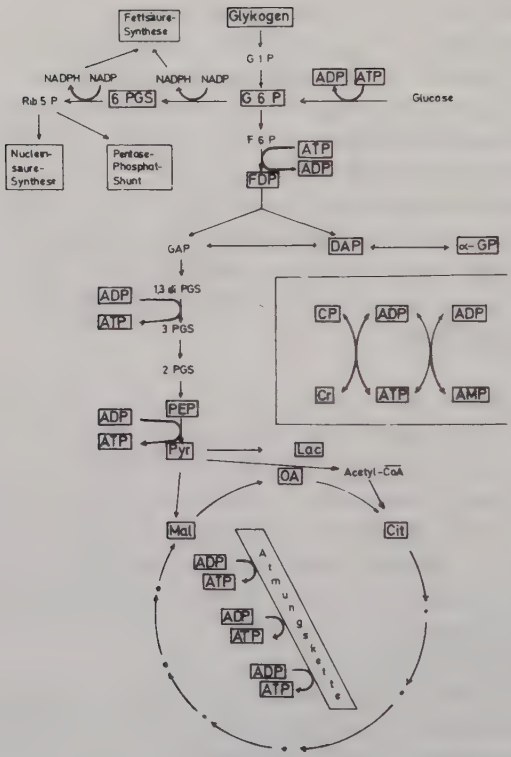


Abb. 3: Metabolite der Glykolyse und des Citratzyklus und energiereiche Phosphate, die in dieser Arbeit untersucht wurden.

3 Untersuchungsgut und Methodik

31 Untersuchungsgut

311 Patienten

Bei zehn Kindern, die an der bösartigen, x-chromosomal rezessiv vererbten, progressiven Muskeldystrophie (=Typ IIIa, Duchenne) erkrankt sind, wurde eine Muskelbiopsie vorgenommen. Die Diagnose wurde aus dem klini-

schen Bild, der Creatin-Kinase-Aktivität im Serum und dem histologischen Befund gestellt. Zur Zuordnung des Schweregrades benutzten wir die Tabelle von Thompson und Vignos in der Modifizierung von Aebi (zitiert bei Rotthauwe (62).

Tabelle IIIa

Patienten, die in dieser Arbeit untersucht wurden

Nr.	Patient	Alter	Klinisch. Stadium	entnommener Muskel	Narkose Lok. anästh.	Muskelanteil	CK mU/ml Serum
1a	Ku.G.	12 J.	8	Tric.surae	Nark.	25%	98mU
2a	E.W.	11 J.	8	"	"	33%	60mU
3a*	K.Th.	16 J.	8	"	"	33%	87mU
4a	P.M.	9 J.	4	Glut.max.	"	33%	49mU
5a	L.R.	11 J.	5	Tric.surae	"	75%	56mU
6a*	K.M.	16 J.	6	"	"	80%	80mU
7a	B.M.	8 J.	5	"	"	80%	38mU
8a	Ka.G.	8 J.	3	"	"	90%	127mU
9a	H.M.	12 J.	8	Tric.surae	L.A.	60%	45mU
10a	L.P.	11 J.	8	"	"	75%	119mU

*) Patienten 3a und 6a sind Zwillingsbrüder.

Die Biopsien wurden an den jeweils am besten erhaltenen Muskeln des Beckens oder der Beine durchgeführt, um möglichst intaktes Gewebe zu entnehmen. Zur Funktionsprüfung der Muskulatur diente eine mit der hiesigen Krankengymnastinnenschule entwickelte Versuchsanordnung, bei der Kraft und Ausdauer geprüft werden (W.Barthelmai (3)).
Die Exzision erfolgte in Halothan-Narkose. Bei zwei Probanden wurde die Biopsie in Lokalanästhesie mit 1%iger Hostacain-Lösung durchgeführt, wobei nur Cutis und Subcutis infiltriert wurden.
Es wurde zunächst sorgfältig Cutis und das darunterliegende Fettgewebe abpräpariert, der freigelegte Muskel mit einer stumpfen Pinzette vorsichtig gefaßt, so schnell als möglich ein etwa 0,5-1,0 g schweres Gewebsstückchen mit einem Skalpell abgetrennt und in flüssigen Stickstoff geworfen. Vom ersten Fassen des Muskels bis zum Eintauchen des Exzisionsmaterials in den Stickstoff verstrichen jeweils etwa 30 Sekunden. Anschließend wurde ein etwa ebenso großes Muskelstück zur Enzymbestimmung und histologischen Beurteilung gewonnen und bis zur Weiterverarbeitung, die spätestens nach einer Stunde erfolgte, in einer feuchten Kammer bei 0° Celsius aufbewahrt.
Auf einer Nadelbiopsie, wie sie von Hultmann (36) beschrieben wird, wurde bewußt verzichtet, da der ausgewählte Muskel unter Sicht des Auges entnommen werden sollte und mehr Material benötigt wurde, als durch diese Methode zu erhalten gewesen wäre.

In den Jahren 1963/64 waren erste vorbereitende Untersuchungen dieser Art am Muskelbiopsiematerial unserer DMP-Patienten unternommen worden*. Damals erfolgte die Probeexzision unter Jodoform-Lachgas-Narkose.
Es kamen dabei folgende Patienten zur Untersuchung:

Tabelle III b:

Patienten der Voruntersuchung

Nr.	Patient	Alter	klin. Stad.	entnom. Muskel	Narkose	Musk. Anteil	S-CK** mU/ml Serum
1b	K.Th.	12 J.	3	Glut.max.	Voll-N.	25%	21mU
2b	F.F.	11 J.	7	Quadric.fem.	"	33%	13mU
3b	H.M.	8 J.	4	Glut.max.	"	50%	127mU
4b	K.M.	12 J.	2	Biceps fem.	"	75%	17mU
5b	K.W.	4 J.	2	Quadric.fem.	"	-	49mU

Die Patienten 1b und 4b sind Zwillinge und dieselben wie 3a und 6a der Tabelle IIIa.
Patient 3b ist identisch mit Patient 9a.
Die Patienten 2b und 5b sind Vettern mütterlicherseits.
Vom Patienten 5b wurden im hiesigen Institut für Physikalische Biologie und Elektronenmikroskopie elektronenoptische Aufnahmen angefertigt mit folgendem Befund:

---

* Die Substratbestimmungen wurden von Herrn Prof.Hohorst und seinen Mitarbeitern durchgeführt.

** CK-Bestimmungen noch ohne GSH-Zusatz, daher niedrigere Werte.

Aufnahme Nr. 34137 (Übersichtsaufnahme) und
Nr. 34140 (Ausschnittsvergrößerung)

Massive Veränderungen und teilweise völliger Schwund der Mitochondrien. Am ursprünglichen Ort der Mitochondrien sind nur noch große Vacuolen vorhanden. Dieser Befund geht über mögliche artifizielle Schädigungen weit hinaus. Auf der Ausschnittsvergrößerung ist die Abnahme an Glykogen deutlich erkennbar. Ferner fällt eine desorganisierte Querstreifung auf: die Z-Linien sind als Kontraktionsstreifen angedeutet, I-Bänder und M-Bandregionen sind nicht nachweisbar.

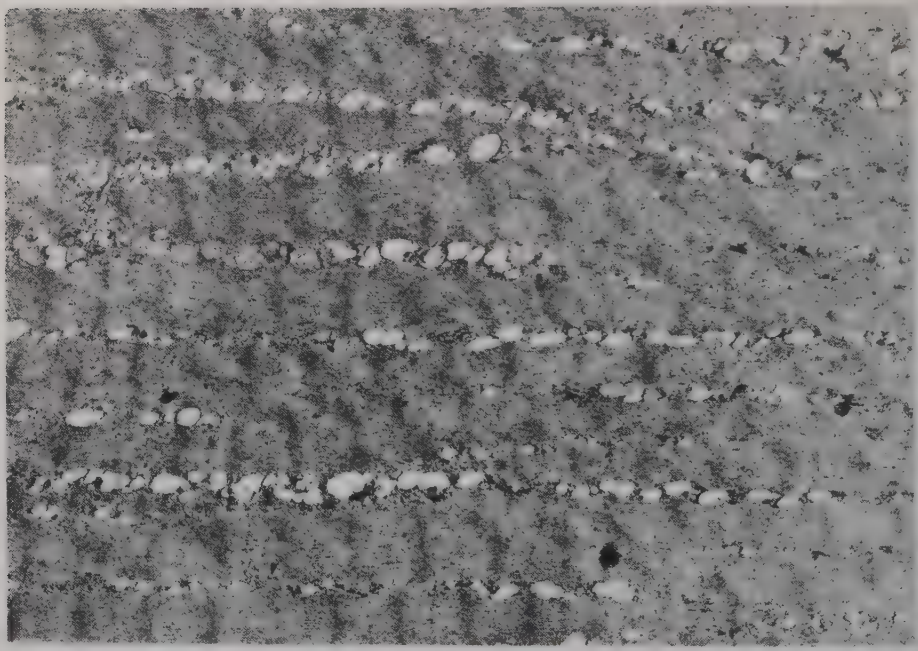


Abb. 34137
ca. 12 5oo fache Vergrößerung

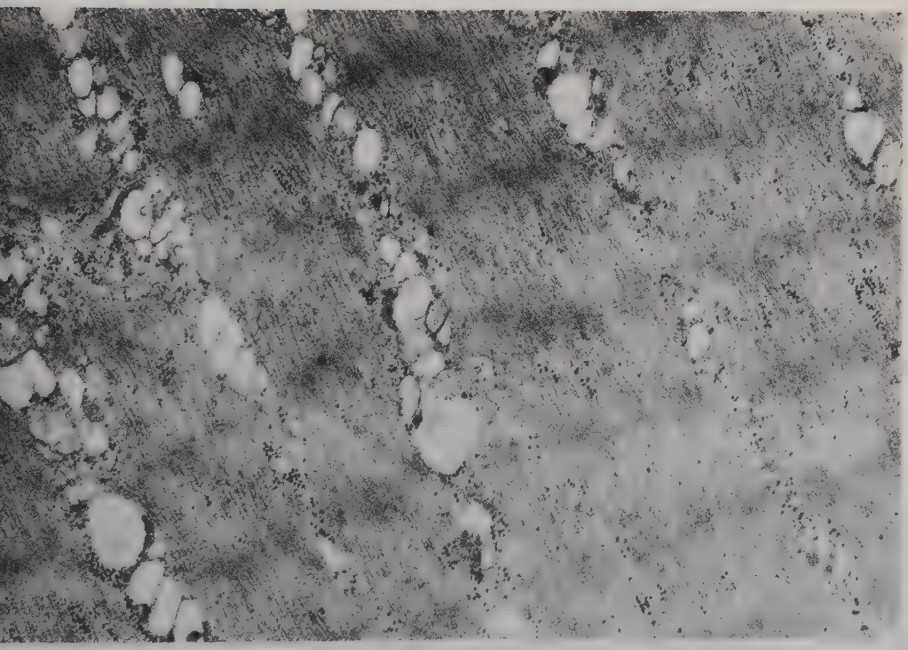


Abb. 34 140

ca. 30 000 fache Vergrößerung

Aufnahme Nr. 34 119 (Übersichtsaufnahme) und
Nr. 34 020 (Ausschnittsvergrößerung)

Auf diesen beiden Aufnahmen ist die Vacuolisierung nicht so ausgeprägt. Allerdings sind auch hier kaum Mitochondrien erkennbar. Der Glykogengehalt ist stärker als auf den vorausgegangenen Aufnahmen und die Querstreifen der Muskulatur etwas besser erhalten. Die Z-Linien sind relativ deutlich, wenn auch vermutlich infolge des Kontraktionszustandes der Muskulatur stark verbreitert. Die M-Bänder sind nur andeutungsweise erkennbar.

Beim Vergleich beider Aufnahmen läßt sich feststellen, daß der Schwund an Glykogen und der Zerfall der Mitochondrien morphologisch parallel gehen, ohne daß sich daraus ein kausaler Zusammenhang ableiten ließe.

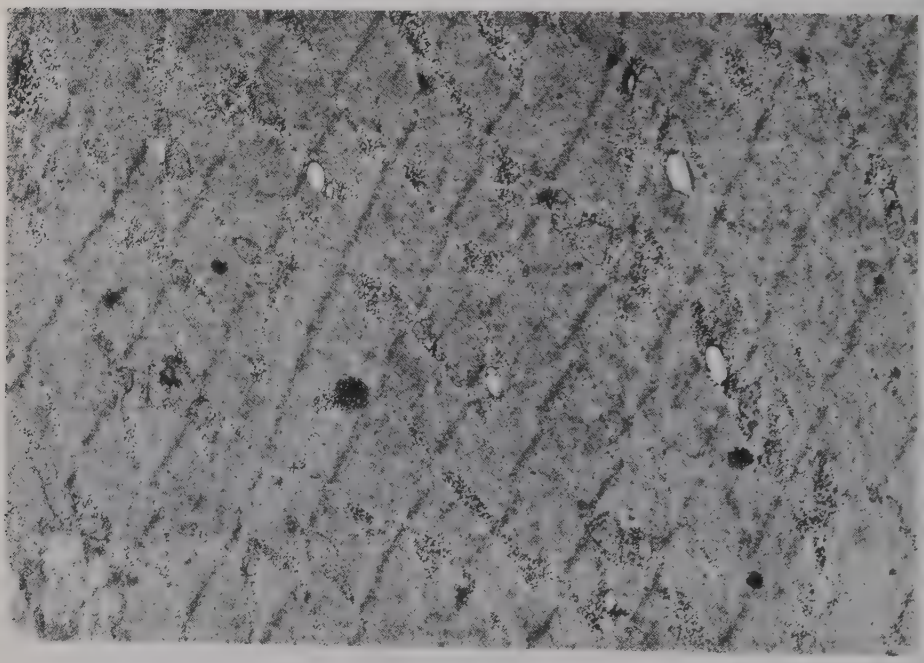


Abb. 34 119
ca. 12 500 fache Vergrößerung

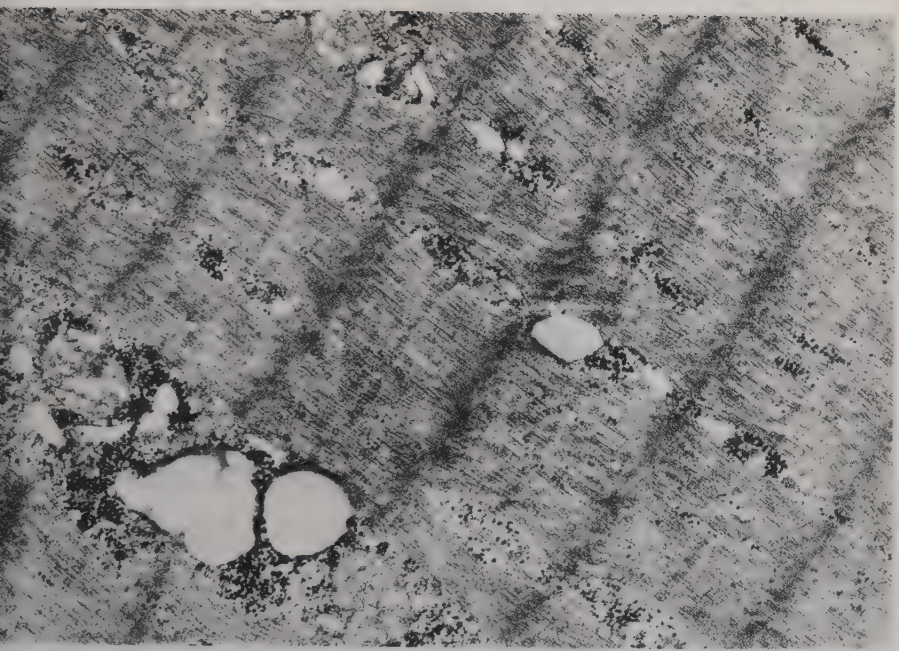


Abb. 34 020

ca. 30 000 fache Vergrößerung

3 1 2 Normalkollektiv

Als Vergleichskollektiv dienten Patienten der Chirurgischen Univ.-Klinik, die wegen Nephrolithiasis, Cholelithiasis, Ulcus duodeni und ähnlichem zur Operation kamen. Das Alter der Patienten betrug nicht mehr als 40 Jahre. Die Metabolit-Werte eines 9-jährigen Jungen mit Nephrolithiasis lagen im gleichen Bereich wie die der Erwachsenen. Alle Personen des Normalkollektivs wurden, wie die DMP-Patienten, unter Halothan-Lachgas-Narkose operiert. Die Gewebsentnahme wurde etwas weniger sorgfältig als bei den DMP-Patienten durchgeführt.

3.2. Meßmethodik

3 2 1 Substratmessungen

3 2 1 1 Extraktbereitung

Bereitung des Muskelextraktes zur Substratmessung *: Pulverisieren des Gewebsstückchens in einem Porzellanmörser unter häufigem Übergießen mit flüssigem N_2. Wägen eines Glasröhrchens mit 5 ml eiskalter 0,6 M $HClO_4$, nach Zugabe des pulverisierten Gewebes zweite Wägung (=definitive Bestimmung der Gewebsmenge). Mehrmalige Homogenisation des Gewebsbreies mit dem Ultra-Turrax**. Das ausgefällte Protein wurde bei ca. 3 000 x g abzentrifugiert, der Überstand dekantiert, der Bodensatz mit 5 ml 0,3 M $HClO_4$ nachextrahiert und erneut bei 3000 x g zentrifugiert. Die vereinigten Überstände wurden mit 10 N KOH auf pH 6 - 7 eingestellt. Diese Arbeiten erfolgten bei 4° C.

3 2 1 2 Bestimmungsmethoden

Die Substrate wurden sofort in NAD-, NADH- und NADP-abhängigen Reaktionen enzymatisch bestimmt***. Wenn möglich, wurden in einer Kuvette mehrere Reaktionen hintereinander gestartet.
Sämtliche Messungen wurden mit dem Photometer "Eppendorf"**** durchgeführt. Die Reaktionstemperatur betrug jeweils 25° C, die Schichtdicke 40 mm, die Wellenlängen 334 nm und 366 nm

---

* persönl. Mitteilung Prof. Hohorst
** Fa. Kunkel & Janke, Adresse: Staufen, Breisgau
*** nach Bergmeyer (6) und persönlichen Mitteilungen von Hohorst u. Barthelmai
**** Fa. Eppendorf-Gerätebau, Hamburg 63,Postfach 63o324

Testzusammensetzungen:

1.) α-GP, Malat u. Lactat

Glycin-Hydrazin-Puffer		pH	9,5
Glycin			0,7 M
Hydrazin			0,3 M
EDTA			3,5 mM
NAD			2,3 mM
Extrakt	0,5 ml	ad	4,0 ml
MDH			36 U
GDH			1,6 U
LDH			36 U

2.) OA, DAP, FDP

TRAP pH 7,6			50,0 mM
EDTA			5,0 mM
NADH			0,02 mM
Extrakt	2,5 ml	ad	5,0 ml
MDH			3,6 U
GDH			0,16 U
TIM			24 U
Ald			0,36 U

Ausnahmsweise wurde bei dieser Reaktion eine Schichtdicke von 50 mm verwendet.

6 PGS u. G6P		
TRAP pH 7,6	60,0	mM
EDTA	6,0	mM
$MgCl_2$	2,5	mM
NADP	0,4	mM
Extrakt 1,5 ml ad	4,0	ml
6PGDH	2,4	U
G6PDH	0,14	U

G6P, ATP, CP		
TRAP pH 7,6	90,0	mM
EDTA	9,0	mM
$MgSO_4$	12,5	mM
NADP	0,4	mM
Glucose	1,3	mM
Extrakt 0,05ml ad	4,0	ml
ADP	0,4	mM
G6PDH	0,14	U
HK	5,6	U
CK	1,8	U

ADP, AMP		
TRAP pH 7,6	93,0	mM
EDTA	9,0	mM
$MgSO_4$	12,5	mM
NADH	0,04	mM
PEP	12,5	mM
Extrakt 0,15ml ad	4,0	ml
LDH	3,6	U
PK	1,2	U
AdK	1,4	U

Creatin

TRAP pH 8,5	87,0	mM
EDTA	5,0	mM
$MgSO_4$	12,5	mM
NADH	0,08	mM
PEP	12,5	mM
ATP	2,0	mM
Extrakt 0,05ml ad	4,0	ml
LDH	7,2	U
CP	1,2	U
CK	9,0	U

Citrat

TRAP pH 7,6	73,0	mM
$ZnCl_2$	0,4	mM
NADH	0,04	mM
Extrakt 0,5ml ad	4,0	ml
LDH	1,8	U
MDH	3,6	U
CL	1,6	U

Pyruvat u. PEP

TRAP pH 7,6	73,0	mM
EDTA	7,0	mM
$MgSO_4$	12,5	mM
NADH	0,04	mM
ADP	0,4	mM
Extrakt 1,0ml ad	4,0	ml
LDH	1,8	U
PK	1,2	U

Glykogen - Glucose

TRAP pH 7,6	85,0	mM
EDTA	9,0	mM
$MgSO_4$	12,5	mM
NADP	0,4	mM
ATP	0,4	mM
Extrakt 0,5 ml ad	4,0	ml
G6PDH	0,14	U
HK	5,6	U

Reaktionsgleichungen und Erläuterungen zu den Reaktionen

α-GP, Malat und Lactat

α-GP + Hydrazin + $NAD^{\oplus} \xrightarrow{GDH}$ DAP - Hydrazon + NADH + $H^{\oplus}$

Malat + Hydrazin + $NAD^{\oplus} \xrightarrow{MDH}$ OA - Hydrazon + NADH + $H^{\oplus}$

Lactat + Hydrazin + $NAD^{\oplus} \xrightarrow{LDH}$ Pyr.-Hydrazon + NADH + $H^{\oplus}$

Da das Gleichgewicht dieser drei Reaktionen auf der linken Seite liegt, wurden das gebildete DAP, OA und Pyruvat durch die entsprechenden Hydrazone aus der Reaktion entfernt.

OA, DAP, FDP

OA + NADH + $H^{\oplus} \xrightarrow{MDH}$ Malat + $NAD^{\oplus}$

DAP + NADH + $H^{\oplus} \xrightarrow{GDH}$ α-GP + NAD^{+}

FDP (zusammengesetzter Test:)

a) FDP $\xrightarrow{Ald}$ GAP + DAP

b) GAP $\xrightarrow{TIM}$ DAP

c) 2DAP + 2NADH + 2 $H^{\oplus} \xrightarrow{GDH}$ 2 α-GP + 2 $NAD^{\oplus}$

6-PGS und G-6-P

6-PGS + $NADP^{\oplus} \xrightarrow{6\text{-}PGDH}$ Rib-5-P + CO_2 + NADPH + $H^{\oplus}$

G6P + $NADP^{\oplus} \xrightarrow{G6PDH}$ 6-PGS + NADPH + $H^{\oplus}$

Da das 6-PGS-Lacton in diesem Reaktionsgemisch weiterreagiert über 6-PGS zu Rib-5-P, diese Reaktion aber merklich langsamer verläuft als die Oxydation von G-6-P, muß der Endpunkt der 6-PGDH-Reaktion aus der Kurve extrapoliert werden.

G6P, ATP und CP

G6P + $NADP^{\oplus} \xrightarrow{G6PDH}$ 6PGS + NADPH + $H^{\oplus}$

ATP + Glucose $\xrightarrow{HK}$ G6P + ADP

CP + ADP $\xrightarrow{CK}$ ATP + Creatin

Die einzelnen Substrate wurden durch jeweilige Enzyminkubation hintereinander gestartet.

ADP und AMP

$$AMP + ATP \xrightarrow{AdK} 2ADP$$

$$2ADP + 2\ PEP \xrightarrow{PK} 2\ Pyr + 2\ ATP$$

$$2\ Pyr + 2\ NADH + 2\ H^{\oplus} \xrightarrow{LDH} 2\ Lac + 2\ NAD^{\oplus}$$

Creatin

a) $Creatin + ATP \xrightarrow{CK} CP + ADP$

b) $ADP + PEP \xrightarrow{PK} ATP + Pyr$

c) $Pyr + NADH + H^{\oplus} \xrightarrow{LDH} Lac + NAD^{\oplus}$

Da das pH-Optimum für die CK etwa bei pH = 9 liegt, die pH-Optima für LDH und PK jedoch bei pH = 7, bewährte es sich, diese Reaktion bei pH = 8,5 ablaufen zu lassen.

Citrat

a) $Citrat \xrightarrow{CL} OA + Acetat$

b_1) $OA + NADH + H^{\oplus} \xrightarrow{MDH} Malat + NAD^{\oplus}$

Das CL-Präparat ist mit OA-Decarboxylase verunreinigt, wobei OA in Pyr und CO_2 zerfällt:

b_2) $OA \xrightarrow{OA\text{-}Decarboxylase} Pyr + CO_2$

Dieser OA-Anteil wird durch folgende Reaktion erfaßt:

c) $Pyr + NADH + H^{\oplus} \xrightarrow{LDH} Lactat + NAD^{\oplus}$

Pyruvat und PEP

$$PEP + ADP \xrightarrow{PK} ATP + Pyruvat$$

$$Pyruvat + NADH + H^{\oplus} \xrightarrow{LDH} Lactat + NAD^{\oplus}$$

Glykogenbestimmung

Die Fällung des Glykogens erfolgte mit geringer Modifikation nach Hultman (36):
1 ml Gewebsextrakt wird mit 10 ml absolutem Alkohol versetzt, gut gemischt und bei Raumtemperatur für 12^h stehengelassen. Anschließend Zentrifugation bei 3000 x g für 10 Minuten. Nach vorsichtigem Absaugen des Überstandes erneute Durchmischung des Bodensatzes mit 10 ml absolutem Alkohol, anschließend Zentrifugation wie oben. Nach Dekantieren des Überstandes wird das Sediment an der Luft getrocknet. Das ausgefallene Glykogen wird 90 Minuten bei 100° C in 1 ml 2 N H_2SO_4 zu Glucose hydrolysiert. Nach Abkühlen Neutralisation mit gesättigter Na_2HCO_3-Lösung.

Reaktionsgleichung für Glucose-Bestimmung

a) Glucose + ATP $\xrightarrow{HK}$ G-6P + ADP

b) G6P + $NADP^{\oplus}$ $\xrightarrow{G6PDH}$ 6-PGS + NADPH + $H^{\oplus}$

3 2 2 Enzym-Messungen

3 2 2 1 Extrakt-Herstellung

0,5 - 1 g Gewebe wurde grob vom anhaftenden Bindegewebe und Fett befreit, vorsichtig zwischen Filterpapier getrocknet und in ein Medium folgender Zusammensetzung eingebracht. (42)

Kalium-Phosphatpuffer pH = 7,2	100 mM
EDTA	2 mM
GSH	10 mM

Wiegen des Muskelstückchens. Zerkleinerung mit einer Schere. Homogenisation 4mal 10 Sekunden mit dem Ultra-Turrax. Ein Aliquot zur 6-PGDH-Bestimmung wurde 10 Minuten bei ca. 180 x g zentrifugiert und der klare Überstand verwendet. Für die strukturgebundenen Enzyme SDH und α-GPox verbot sich ein derartiges Vorgehen.

Der Blutgehalt des Gewebes wurde nicht berücksichtigt, wenn auch die geringe 6-PGDH-Aktivität im Muskel auf Blutbeimengung zurückgehen soll (31).
Alle Arbeiten erfolgten bei 4° C.

3 2 2 2 Bestimmungsmethoden

SDH und α-GPOx

Beide Enzyme wurden nach Angaben von Kadenbach (42) gemessen.
Prinzip: Messung der Reduktion des Cytochrom C bei 546 nm.
Die Reoxydation durch im Gewebe vorhandene Cytochrom-C-Oxydase wird durch KCN unterbunden.

Testzusammensetzung für die SDH-Bestimmung:

Kalium-Phosphat-Puffer pH = 7,4		180 mM
EDTA		5 mM
KCN		1 mM
Cyt c	ca.	0,1 %
Extrakt 0,05 ml	ad	2 ml
Start mit Succinat		20 mM

α-GPOx-Bestimmung:

Kaliumphosphat-Puffer pH = 7,4		160 mM
EDTA		5 mM
KCN		1 mM
$MgCl_2$		10 mM
Cyt c	ca.	0,1 %
Extrakt 0,1 ml	ad	2 ml
Start mit α-GP		20 mM

6-PGDH-Messung*

TRAP pH = 7,6		90 mM
EDTA		9 mM
$MgSO_4$		12,5 mM
NADP		1,5 mM
Extrakt 0,1 ml	ad	2 ml
6-PGS		1 mM
λ = 334 nm		

* W. Barthelmai, persönliche Mitteilung.

Bei allen Enzymbestimmungen betrug die Schichtdicke 10 mm, die Reaktionstemperatur 25° C.

3.3 NCN-Bestimmung

Das Kollagen und Elastin wurde nach Lilienthal (47) abgetrennt.
Zur N-Bestimmung wurde die Vorschrift von Rappaport(56) benutzt.

4 Ergebnisse

Vorbemerkung:

Die Meßwerte der Patienten 9a und 10a (Tab. IIIa), die unter Lokalanästhesie operiert wurden, liegen soweit außerhalb der übrigen Meßwerte, daß sie in der Auswertung nicht berücksichtigt wurden (Vergleiche Tab. X und XI). Die stärksten Abweichungen im Metabolitgehalt dystropher Muskulatur findet man bei den Autoren, die ihr Material unter Lokalanästhesie entnommen haben (Vergleiche Tab. II).

4.1 Mittelwerte der Ergebnisse

4.1.1 Substratwerte bezogen auf FG

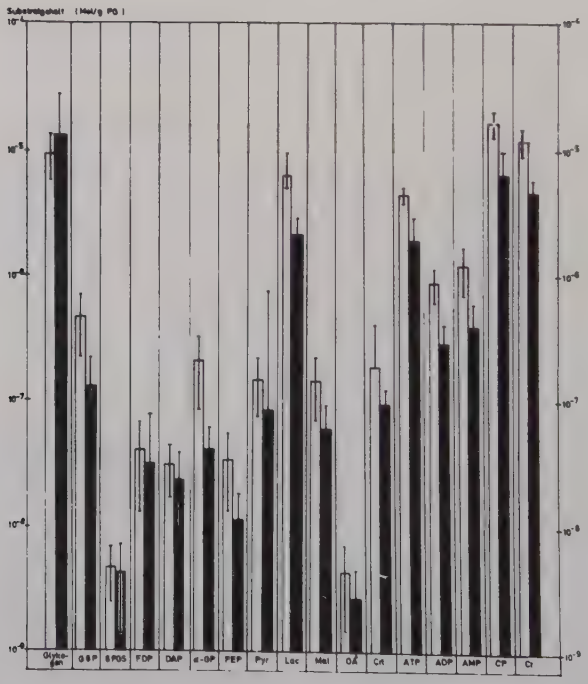


Abb. 4: Mittlere Substratgehalte der DMP-Patienten im Vergleich zu den Metabolitgehalten des Normalkollektivs, bezogen auf g FG.
Säulenhöhe = $\bar{M} \pm s$

□ Normalkollektiv ■ Patienten

Tabelle IV

Substratmittelwerte in Rattenmuskulatur*, sowie im Muskelgewebe von gesunden Menschen und DMP-Patienten, bezogen auf g FG.

	Ratte		Mensch, gesund				DMP-Patienten					
Substrate	$\bar{M}$(Mol/gFG)	σ_M	$\bar{M}$(Mol/gFG)	σ	σ_M	n	$\bar{M}$(Mol/gFG)	σ	σ_M	n	p	Abweichung der DMP-Pat. v.d.Gesunden (%)
Glykogen	$29{,}6 \cdot 10^{-6}$	1,1	$9{,}2 \cdot 10^{-6}$	3,6	1,5	6	$12{,}6 \cdot 10^{-6}$	14,9	5,6	7		140%
G6P	$0{,}77 \cdot 10^{-6}$	0,1	$0{,}46 \cdot 10^{-6}$	0,24	0,07	11	$0{,}13 \cdot 10^{-6}$	0,10	0,04	8	<0,01	30%
6PGS	-	-	$0{,}47 \cdot 10^{-8}$	0,22	0,11	4	$0{,}43 \cdot 10^{-8}$	0,29	0,11	7		90%
FDP	$5{,}0 \cdot 10^{-8}$	0,6	$4{,}1 \cdot 10^{-8}$	2,8	0,84	11	$3{,}2 \cdot 10^{-8}$	4,8	1,7	8		80%
DAP	$3{,}1 \cdot 10^{-8}$	0,3	$3{,}1 \cdot 10^{-8}$	1,4	0,42	11	$2{,}4 \cdot 10^{-8}$	1,5	0,53	8		80%
α-GP	$13{,}0 \cdot 10^{-8}$	1,6	$20{,}6 \cdot 10^{-8}$	12,1	3,8	10	$4{,}1 \cdot 10^{-8}$	2,0	0,69	8	<0,001	20%
PEP	$1{,}3 \cdot 10^{-8}$	0,1	$3{,}4 \cdot 10^{-8}$	2,1	0,63	11	$1{,}1 \cdot 10^{-8}$	0,7	0,24	8		30%
Pyr	$9{,}7 \cdot 10^{-8}$	0,7	$14{,}9 \cdot 10^{-8}$	7,4	2,2	11	$8{,}5 \cdot 10^{-8}$	9,2	3,3	8		60%

Legende: $\bar{M}$ = arithmet. Mittelwert, $\pm\sigma$ = Standardabweichung, $\pm\sigma_M$ = Standardabweichung des Mittelwertes
n = Anzahl der untersuchten Fälle, p = Wahrscheinlichkeit, daß die Mittelwerte nur zufällig voneinander abweichen.

*H.J. Hohorst (33)

Fortsetzung Tabelle IV

	Ratte		Mensch, gesund				DMP-Patienten					
Substrate	$\overline{M}$(Mol/gFG)	σ_M	$\overline{M}$(Mol/gFG)	σ	σ_M	n	$\overline{M}$(Mol/gFG)	σ	σ_M	n	p	Abweichung der DMP-Pat. v.d.Gesunden (%)
Lac	$2{,}1 \cdot 10^{-6}$	0,14	$6{,}1 \cdot 10^{-6}$	3,2	1,0	11	$2{,}1 \cdot 10^{-6}$	0,7	0,24	8	$<0{,}001$	40%
Mal	$7{,}5 \cdot 10^{-8}$	0,6	$14{,}6 \cdot 10^{-8}$	7,6	2,3	11	$6{,}1 \cdot 10^{-8}$	3,3	1,2	8	$<0{,}01$	40%
OA	$0{,}14 \cdot 10^{-8}$	0,02	$0{,}44 \cdot 10^{-8}$	0,29	0,09	10	$0{,}27 \cdot 10^{-8}$	0,18	0,06	8		60%
Cit	$14{,}7 \cdot 10^{-8}$	3,6	$18{,}9 \cdot 10^{-8}$	23,1	8,2	9	$9{,}4 \cdot 10^{-8}$	2,7	0,95	8		50%
ATP	$6{,}1 \cdot 10^{-6}$	0,12	$4{,}4 \cdot 10^{-6}$	0,64	0,19	11	$1{,}9 \cdot 10^{-6}$	0,99	0,35	8	$<0{,}001$	40%
ADP	$0{,}74 \cdot 10^{-6}$	0,024	$0{,}89 \cdot 10^{-6}$	0,28	0,09	11	$0{,}29 \cdot 10^{-6}$	0,12	0,04	8	$<0{,}001$	30%
AMP	$0{,}13 \cdot 10^{-6}$	0,02	$1{,}2 \cdot 10^{-6}$	0,50	0,15	11	$0{,}41 \cdot 10^{-6}$	0,19	0,07	8	$<0{,}001$	40%
CP	$21{,}2 \cdot 10^{-6}$	0,8	$16{,}3 \cdot 10^{-6}$	3,8	1,2	11	$6{,}3 \cdot 10^{-6}$	3,3	1,21	8	$<0{,}001$	40%
Cr	$11{,}3 \cdot 10^{-6}$	1,1	$11{,}9 \cdot 10^{-6}$	3,0	0,90	11	$4{,}5 \cdot 10^{-6}$	1,2	0,41	8	$<0{,}001$	40%
Lac/Pyr	22	-	36	20	6	11	38	19	7	8		
α-GP/DAP	4,2	-	5,3	3,3	1,1	10	3,3	0,70	0,26	7		
Mal/OA	54	-	115	113	34	11	27	19	7	7		
ATP/ADP	8,3	-	4,9	1,1	0,34	11	6,7	3,3	1,2	8		
CP/Cr	1,9	-	1,2	0,4	0,12	11	1,4	0,73	0,26	8		
NCN	-	-	31,1mg	9	2,7	11	27,6mg	11,3	3,7	9		

Erläuterungen zur Tabelle IV

Bemerkungen zu den Werten des Normalkollektivs

Wenn die von Hohorst in Ratten gefundenen Metabolitgehalte mit den Normalwerten dieser Arbeit verglichen werden, so fällt folgendes auf:

1.) Die Streubreite der Werte aus Rattenmuskulatur liegt bei etwa 10 %, die der unseren zwischen 10-20 %. Nur die Citratgehalte fallen mit einer Streubreite von 45 % aus dem Rahmen. Störend sollen sich hier vor allem die Perchlorat-Jonen auswirken, die Hohorst durch Jonenaustauscher entfernt hatte. Trotzdem traten auch danach noch unter den Citratgehalten die stärksten Streuungen auf.

2.) Die Metabolite, die am Beginn der Glykolyse-Kette stehen, bis einschließlich des FDP, ferner ATP und CP, liegen in der angeführten Rattenmuskulatur eindeutig höher, während die Gehalte der Metabolite, die am Ende der Glykolysekette und im Citratzyklus stehen, sowie ADP, AMP und Creatin bei der Ratte niedriger gefunden wurden.

Es ist möglich, daß der menschliche Muskel andere Metabolitgehalte aufweist als die Ratte. Die Differenzen legen jedoch den Verdacht nahe, daß diese Unterschiede durch die Entnahmetechnik bedingt sind. Im Tierversuch läßt sich die optimale "Frier-Stop-Methode" anwenden. Ein solches Vorgehen verbietet sich jedoch am Menschen. Die AMP-Differenz von einer Zehnerpotenz zwischen den Werten der Rattenmuskulatur und unseren Werten könnte mit der unterschiedlichen Gewebsgewinnung erklärbar sein, da das AMP, gemeinsam mit organischem Phosphat, äußerst empfindlich auf Reizung des Muskels reagiert(Hohorst,persönl.Mitteilung). Leider scheitert der Vergleich von menschlichen Normalwerten der einzelnen Autoren an der unterschiedlichen Methodik, vor allem auch an den verschiedenen Bezugssystemen.

Patientenwerte

Mit Ausnahme des Glykogengehaltes wurde der Gehalt aller übrigen untersuchten Metabolite erniedrigt gefunden. Das Glykogen fand sich bei den Patienten auf 140 % erhöht, allerdings nicht signifikant. Dies steht im Widerspruch zu allen bisherigen Untersuchern, die meist einen Abfall angeben (16, 22, 23, 30, 38, 72), wobei die Daten allerdings zwischen 20 und 65 % schwanken. Auch die elektronenoptische Betrachtung von Muskelmaterial des Falles 5b (s.S.32ff) zeigt eine Abnahme der Glykogengranula gegenüber einer gesunden Glykogenverteilung. Eine Deutung dieses Befundes wird später gegeben.

Glukose-6 Phosphat und Lactat sind mit 30 % bzw. 40 % der Normalwerte signifikant erniedrigt, ebenso ist α-GP auf 20 % abgesunken. Der Abfall der übrigen Glykosemetabolite ist unterschiedlich und nicht signifikant. Debre (17) und Collazo (16) stellten keine Veränderung des Lactatgehaltes fest.

Das Malat war bei den Patienten mit einer Signifikanz von p 0,01 auf 40 %, OA und Citrat nicht signifikant auf 60 % erniedrigt. Nach Taussky (69) soll der Citratgehalt pro Gramm FG bei muskeldystrophen Tieren auf 200 % der Norm erhöht sein.

In der Gruppe der energiereichen Phosphate ist ein hochsignifikanter Abfall aller Substratgehalte nachweisbar, und zwar ATP, AMP, CP und Creatin auf 40 %, ADP auf 30 % des Normalkollektivs. Dies stimmt mit Untersuchungen anderer Autoren überein (8, 16, 17, 38, 53, 63).

Anhang: Substratgehalte bei den Voruntersuchungen an fünf Patienten mit DMP (Tab. IIIb).

Tabelle V

* Substratmittelwerte der Voruntersuchungsreihe bei 5 DMP-Patienten in Mol/gFG

Substrat	$\bar{M}$ Mol/gFG	σ	σ_M	n
G6P	$0{,}12 \times 10^{-6}$	0,88	0,06	2
FDP	$6{,}5 \times 10^{-8}$	8,6	3,9	5
DAP	$2{,}14 \times 10^{-8}$	1,83	0,82	5
α-GP	$7{,}68 \times 10^{-8}$	3,64	1,82	4
PEP	$0{,}75 \times 10^{-8}$	0,39	0,28	5
Pyr	$3{,}96 \times 10^{-8}$	1,36	0,61	5
Lac	$3{,}69 \times 10^{-6}$	3,41	1,53	5
Mal	$3{,}74 \times 10^{-8}$	1,97	0,99	4
OA	$0{,}22 \times 10^{-8}$	0,08	0,04	5
ATP	$1{,}55 \times 10^{-6}$	0,71	0,32	5
ADP	$0{,}28 \times 10^{-6}$	0,09	0,04	5
AMP	$0{,}26 \times 10^{-6}$	0,15	0,07	5
CP	$4{,}61 \times 10^{-6}$	1,74	0,78	5
Cr	$5{,}84 \times 10^{-6}$	2,65	1,18	5
Lac/Pyr	66	87	38,4	5
α-GP/DAP	4,0	2,0	1,0	4
Mal/OA	24	21,0	10,0	4
ATP/ADP	5,4	1,6	0,75	5
CP/Cr	0,84	0,24	0,11	5

* Diese Bestimmungen wurden 1963 im Labor von Herrn Prof. Dr. Dr. Hohorst durchgeführt.

Der Vergleich zwischen Tabelle IV und Tabelle V zeigt, daß die Ergebnisse beider Meßreihen in etwa übereinstimmen. Der höhere Lactat- und Creatingehalt bzw. der etwas niedrigere ATP- und CP-Gehalt bei den Voruntersuchungen deutet daraufhin, daß der Muskel bei der Biopsie in den Voruntersuchungen etwas mehr gereizt war als bei den Entnahmen für diese Arbeit.

Die Erhöhung des FDP um den Faktor zwei ist durch unsere Art der Berechnung erklärt. Ebenso sei nochmals auf die niedrigeren Werte bei der AMP-Bestimmung hingewiesen.

4 1 2 NCN-Gehalt

Bei der Messung des Non-Kollagen-N-Gehaltes ergab sich im Normalkollektiv ein Mittelwert von 31,1 mg/g $\pm$2,7 FG ($\overline{M} \pm \sigma_M$), der mit der Angabe Lilienthals von 32,4 mg N pro Gramm Muskelgewebe übereinstimmt.

In der dystrophen Muskulatur wurden 27,6 $\pm$ 3,7 g NCN/g FG ($\overline{M} \pm \sigma_M$) gefunden. Der Unterschied zum Normalkollektiv war nicht signifikant. Auch Lochner konnte den NCN-Gehalt des dystrophen M. biceps femoris und M. obliquus externus des Hamsters nicht signifikant erniedrigt nachweisen. Dennoch besteht, wie aus Abbildung 9 (S. 60) hervorgeht, eine streng lineare Beziehung zwischen dem histologisch geschätzten Muskelanteil und dem NCN-Gehalt. Somit ist es wahrscheinlich, daß die mangelnde Signifikanz methodisch bedingt ist.

4 1 3 _ _Substratwerte, auf NCN bezogen

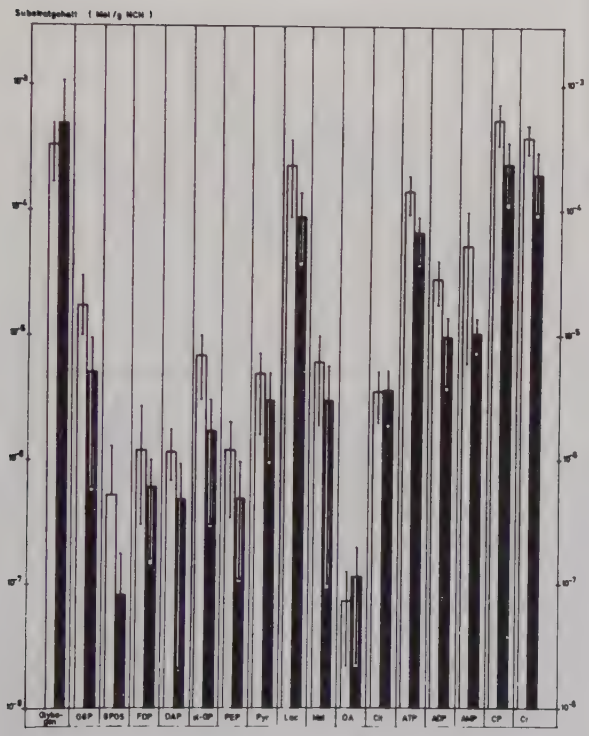


Abb. 5: Substratmittelwerte der Patienten im Vergleich zu den Metabolitgehalten des Normalkollektivs, bezogen auf g NCN. Vergleiche Legende Abb. 4.

Tabelle VI

Substratmittelwerte im Muskel von gesunden Menachen und DMP-Patienten, bezogen auf g NCN

	Gesunde				DMP-Patienten					
Substrat	$\bar{M}$(Mol/gNCN)	σ	σ_M	n	$\bar{M}$(Mol/gNCN)	σ	σ_M	n	p	Abweichung der DMP-Patienten v. d.Gesunden (%)
Glykogen	$32{,}8 \cdot 10^{-5}$	16,0	6,5	6	$48{,}5 \cdot 10^{-5}$	53,6	20,2	7		150%
G6P	$1{,}7 \cdot 10^{-5}$	1,3	0,40	11	$0{,}51 \cdot 10^{-5}$	0,44	0,17	7	$< 0{,}05$	30%
6 PGS	$5{,}2 \cdot 10^{-7}$	7,8	2,0	4	$0{,}81 \cdot 10^{-7}$	0,97	0,40	6		15%
FDP	$12{,}0 \cdot 10^{-7}$	8,7	2,6	11	$6{,}0 \cdot 10^{-7}$	4,4	1,7	7		50%
DAP	$11{,}6 \cdot 10^{-7}$	5,9	1,8	11	$4{,}8 \cdot 10^{-7}$	4,5	1,7	7	$< 0{,}05$	40%
α-GP	$0{,}68 \cdot 10^{-5}$	0,37	0,12	9	$0{,}17 \cdot 10^{-5}$	0,14	0,05	7	$< 0{,}01$	30%
PEP	$11{,}8 \cdot 10^{-7}$	8,4	2,7	10	$4{,}9 \cdot 10^{-7}$	4,8	1,8	7	$< 0{,}05$	40%
Pyr	$0{,}49 \cdot 10^{-5}$	0,23	0,07	11	$0{,}30 \cdot 10^{-5}$	0,20	0,08	7		60%
Lac	$22{,}9 \cdot 10^{-5}$	13,7	4,1	11	$8{,}9 \cdot 10^{-5}$	5,3	2,0	7		40%
Mal	$0{,}62 \cdot 10^{-5}$	0,43	0,13	11	$0{,}29 \cdot 10^{-5}$	0,28	0,11	7		50%
OA	$0{,}73 \cdot 10^{-7}$	0,51	0,16	11	$1{,}2 \cdot 10^{-7}$	0,82	0,31	7		160%
Cit	$0{,}36 \cdot 10^{-5}$	0,16	0,06	8	$0{,}37 \cdot 10^{-5}$	0,17	0,06	7		100%

Fortsetzung Tabelle VI

	Gesunde				DMP-Patienten					
Substrat	$\bar{M}$(Mol/gNCN	σ	σ_M	n	$\bar{M}$(Mol/gNCN)	σ	σ_M	n	p	Abweichung der DMP-Patienten v. d.Gesunden (%)
ATP	$14,2 \cdot 10^{-5}$	4,9	1,5	11	$6,8 \cdot 10^{-5}$	2,9	1,1	7	<0,001	50%
ADP	$2,9 \cdot 10^{-5}$	1,1	0,34	11	$0,99 \cdot 10^{-5}$	0,42	0,16	7	<0,001	30%
AMP	$5,3 \cdot 10^{-5}$	4,7	1,4	11	$1,1 \cdot 10^{-5}$	0,32	0,12	7	<0,01	20%
CP	$52,8 \cdot 10^{-5}$	18,6	5,6	11	$24,2 \cdot 10^{-5}$	11,6	4,4	7	<0,001	50%
Cr	$39,3 \cdot 10^{-5}$	9,8	3,0	11	$18,6 \cdot 10^{-5}$	8,5	3,2	7	<0,001	50%

Da die Quotienten mit den auf Frischgewicht bezogenen Werten praktisch übereinstimmen, wurden sie hier nicht noch einmal aufgeführt.

Erläuterungen zu Tabelle VI

Gegenüber den Ergebnissen, die auf g FG bezogen sind, bestehen nur graduelle Abweichungen.
Der Glykogenanstieg tritt mit 150 % etwas deutlicher hervor, ist aber wiederum nicht signifikant. Wenn man berücksichtigt, daß das σ_M etwa 50 % des Mittelwertes beträgt, kommt dieses Ergebnis dem von Tada (67) und Lochner (48) nahe, die keine Veränderung des Glykogengehaltes pro Gramm NCN finden konnten. Vignos (72) und Hess (30) finden dagegen eine deutliche Glykogenverminderung pro Gramm NCN. G6P, DAP und PEP sind signifikant auf 30 - 40 % des Normalwertes abgesunken, während der FDP-, Pyruvat- und PEP-Abfall auf 40 - 60 % nicht signifikant ist.
Der niedrige 6PGS-Gehalt von 15 % des gesunden Muskels ist wenig wahrscheinlich. Er dürfte mit dem geringen, an der Grenze der Meßbarkeit gelegenen Gehalt und der dadurch bedingten Ungenauigkeit zu erklären sein.
Dem von uns gefundenen Abfall des Pyruvat- und Lactat-Gehaltes widersprechen die Arbeiten von Niebrój-Dobosz (54) mit einem Pyruvat-Anstieg auf 130 % (nicht signifikant) und Hess (30) mit einer Lactat-Erhöhung auf das Doppelte des Normalwertes. Nach Collazo (16) und Debré (17) soll jedoch der Lactat-Gehalt des dystrophen Muskels normal sein.
Bemerkenswerterweise sind die Gehalte an OA und Citrat in beiden Kollektiven gleich hoch, für OA sind sie - zwar nicht signifikant - auf 160 % gestiegen. Auch dieses mag mit dem an der Grenze der Meßbarkeit liegenden, niedrigen OA-Spiegel zusammenhängen. Die ATP-, CP- und Creatingehalte sind gleichmäßig hoch signifikant auf 50 % der Norm abgesunken, ADP auf 30 %. Bemerkenswerterweise finden sich, auf NCN bezogen, nur 20 % des AMP-Gehaltes des gesunden Muskels, der auf Feuchtgewicht bezogen, noch 40 % betrug. Die Werte für ATP liegen mit 50 - 70 % bei anderen Autoren (8, 59, 72) in gleicher Größenordnung. Lochner (48) findet allerdings nur eine minimale ATP-Senkung, Tada (67) überhaupt keine.

ADP ist sowohl bei Vignos als auch bei Lochner nicht verändert, bei Ronzoni mit 70 % mäßig abgesunken.
AMP findet Lochner auf 80 % leicht vermindert.
Sie ist ferner die einzige, die von einem etwa unveränderten CP-Gehalt der dystrophen Muskulatur berichtet. Alle anderen Arbeiten (8, 60, 63, 67, 72) beschreiben mehr oder weniger stark verminderte CP-Gehalte.
Über das Muskel-Creatin liegt nur eine Angabe von Vignos über eine leichte Verminderung auf ca. 85 % vor.

4.2. Ergebnisse der Enzymaktivitäten pro g FG u.pro g NCN

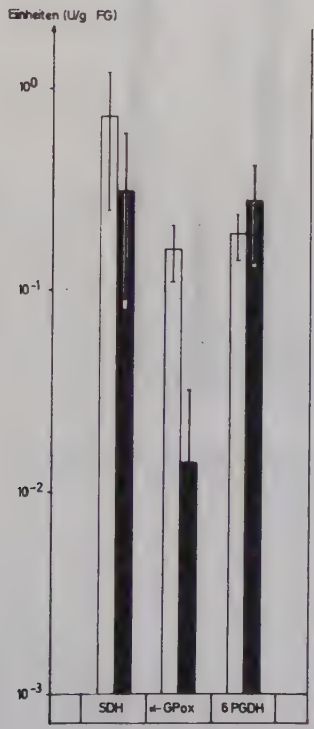


Abb. 6: Mittlere Enzymgehalte des Normalkollektivs und der Patienten, bezogen auf g FG.
Legende wie in Abb. 4.

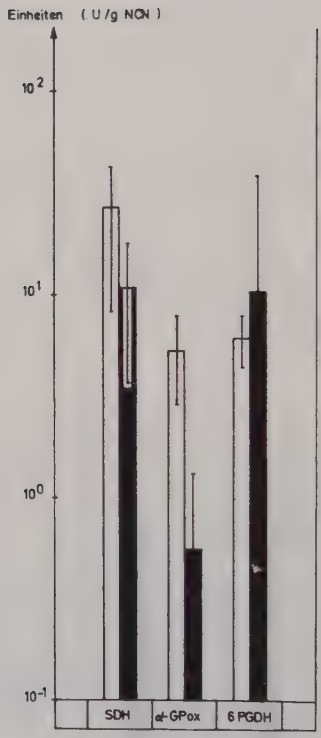


Abb. 7: Mittlere Enzymgehalte des Normalkollektivs und der Patienten, bezogen auf g NCN. Legende wie in Abb. 4.

Tabelle VII

Enzymaktivitäten im Muskel von gesunden Personen und DMP-Patienten

a) Aktivitäten in internationalen Einheiten, bezogen auf g FG (α-GPOx in mU)

	Gesunde				DMP-Patienten					
Enzym	$\bar{M}$(U/gFG)	σ	σ_M	n	$\bar{M}$(U/gFG)	σ	σ_M	n	p	Abweichung d.DMP-Patienten v.d. Gesunden (%)
6-PGDH	0,19 U	0,05	0,02	8	0,28 U	0,14	0,05	7		150 %
SDH	0,73 U	0,48	0,14	11	0,31 U	0,29	0,10	8	<0,05	40 %
α-GPOx	160 mU	55	18	10	14,2 mU	18,1	6,4	8	<0,001	10 %

b) Aktivitäten in internationalen Einheiten, bezogen auf g NCN

	Gesunde				DMP-Patienten					
Enzym	$\bar{M}$(U/gNCN)	σ	σ_M	n	$\bar{M}$(U/gNCN)	σ	σ_M	n	p	Abweichung d.DMP-Patienten v.d. Gesunden (%)
6 PGDH	6,1 U	1,7	0,6	8	10,1 U	28,0	5,3	6		160 %
SDH	25,4 U	17,2	5,2	11	10,8 U	7,1	2,7	7	<0,05	40 %
α-GPOx	5,4 U	2,5	0,75	11	0,56 U	0,75	0,28	7	<0,001	10 %

Erläuterungen zu Tabelle VII

Enzymaktivitäten im Muskel von Normalpersonen

Die 6PGDH-Aktivität liegt in dieser Arbeit mit 0,19 U pro Gramm FG doppelt so hoch wie bei Heyck (31). Die Streuung σ_M beträgt ca. 10 %.
Die Aktivität der SDH beträgt 0,73 U/g FG. Sie zeigt eine ziemlich starke Streuung von 20 % (σ_M). Auf diese Schwankungen der Enzymaktivität wird auch von Kadenbach(42) hingewiesen.
An α-GPOx-Aktivität wurde im gesunden Muskel durchschnittlich 160 mU/g FG gefunden mit einem σ_M von 10 %.

Enzymaktivitäten im Muskel der DMP-Patienten

Die 6PGDH-Aktivität pro Gramm FG beträgt bei den Patienten im Vergleich zu den muskelgesunden Personen 150 %. Dies stimmt mit den Beobachtungen von anderen Autoren überein (12, 14, 27, 31, 48). Allerdings ist diese Steigerung bei uns nicht signifikant.
Die SDH findet sich pro Gramm FG auf 40 % erniedrigt. Dreyfus (21) berichtet von einem Rückgang auf 60 % der Norm.
Außerordentlich bemerkenswert erscheint der Abfall der α-GPOx auf 10 % der Normalwerte.
Die auf NCN bezogenen Meßwerte sind mit den auf FG bezogenen identisch.

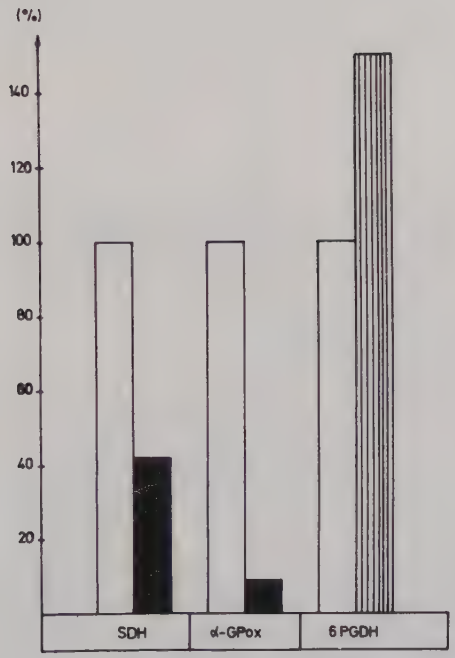


Abb. 8: Verlust bzw. Zuwachs des mittleren Enzymgehaltes der Patiente in Prozent des mittleren Gehaltes des Normalkollektivs.

- Normalkollektiv
- signifikant
- nicht signifikant

4 3 Korrelation der Metabolit- und Enzymgehalte mit den histologischen Befunden

Um die biochemischen Ergebnisse mit den morphologischen zu korrelieren, wurde versucht, aus dem Verhältnis der Metabolitgehalte und Enzymaktivitäten zum histologischen Schweregrad weitere Information zu erhalten.

4 3 1 NCN-Gehalt (Abb. 9)

Wie schon auf Seite 54 erwähnt, steigt der NCN-Gehalt linear mit der noch erhaltenen Muskulatur an, was mit allen Beobachtungen der Literatur übereinstimmt (16, 20, 22, 23, 27, 72).

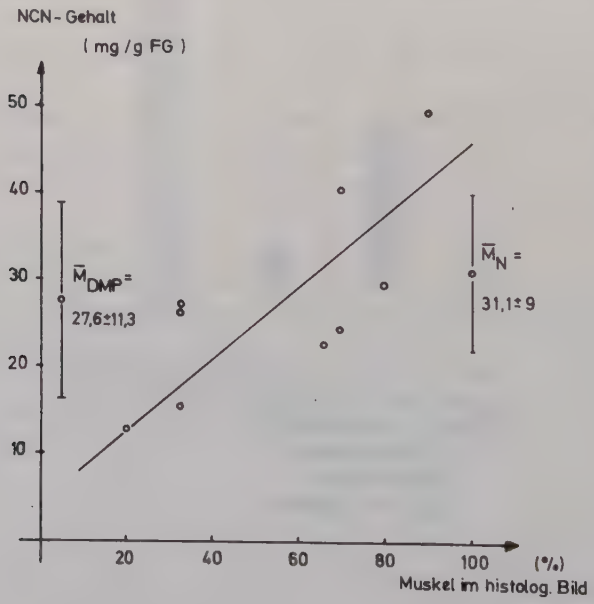


Abb. 9: NCN-Gehalt der Gewebsproben im Verhältnis zum histologisch geschätzten Muskelanteil.
$\bar{M}_N$ = Mittelwert des Normalkollektivs ± σ
$\bar{M}_{DMP}$ = Mittelwert der Patienten ± σ

4 3 2 Substratgehalte

Das Verhalten der Glykolysemetabolite und des Glykogens ist gleichartig. Als Beispiel seien die Kurven von DAP und Pyruvat demonstriert (Abb. 10).

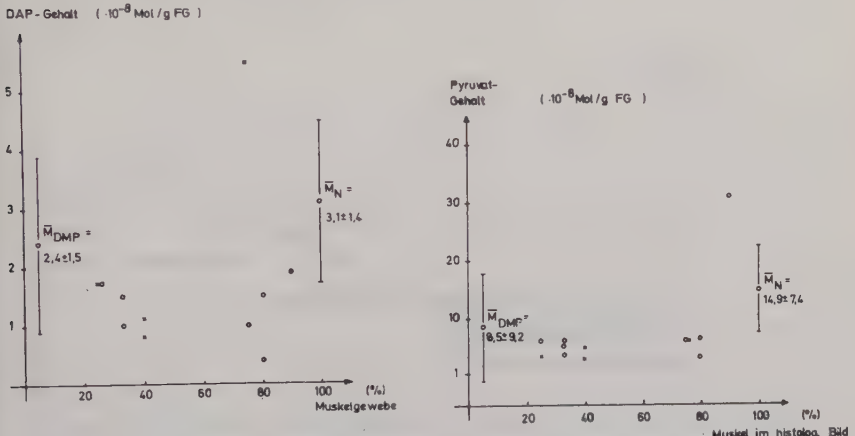


Abb. 10: DAP- und Pyr-Gehalte des Biopsiematerials im Verhältnis zum prozentualen Anteil des Muskelgewebes am histolog. Präparat. Vergleiche Legende Abb. 9.

(x bedeutet in dieser und den folgenden Abbildungen Werte der Patienten aus Tab. IIIb)

Die Metabolitgehalte pro Gramm FG sind als ganzes etwas erniedrigt und bewegen sich im unteren Bereich der Standardabweichung der Einzelwerte des Normalkollektivs. Die Substratgehalte sind unter sich jedoch gleich hoch, unabhängig vom prozentualen Anteil des noch vorhandenen Muskels. Bemerkenswerterweise zeigen die Ergebnisse der Glykogenmessungen analoges Verhalten, trotz des bei den Patienten erhöhten Mittelwertes.

Auch die α-GP/DAP-Quotienten zeigen eine gleichbleibende Höhe um 3,5, woraus geschlossen werden kann, daß sich der α-GP-Gehalt pro Gramm FG im Krankheitsverlauf ebenfalls nicht ändert, ferner (Abb. 11), daß das Enzym, das die Reaktion α-GP $\rightarrow$ DAP + 2H katalysiert, die GDH, in genügendem Ausmaß aktiv ist.

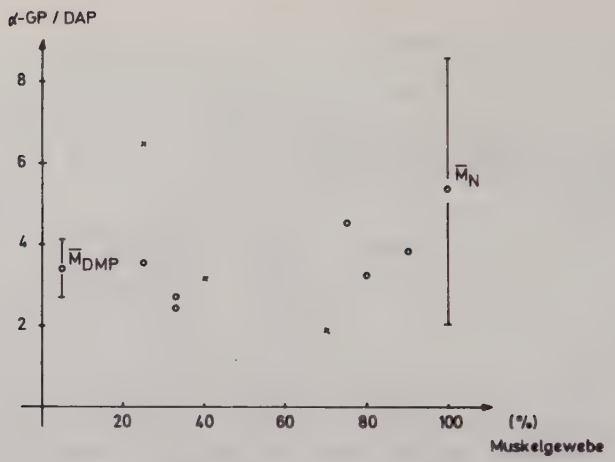


Abb. 11: α-GP/DAP-Quotienten je nach histolog. geschätztem Muskelanteil.
Vergleiche Legende Abb. 9.

Im Citratzyklus ergibt sich dasselbe Bild, das heißt, OA und Citrat als Beispiele bleiben vom Fortschreiten des dystrophen Prozesses unberührt (Abb. 12).

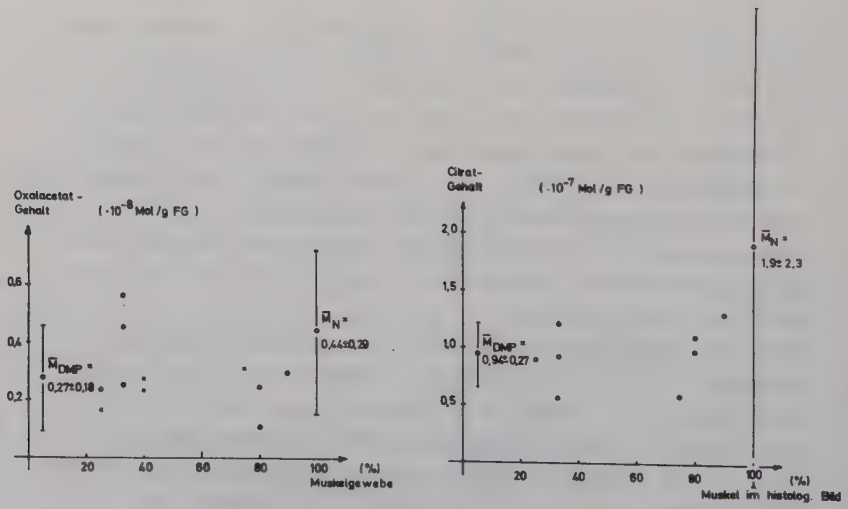


Abb. 12: OA- und Citrat-Gehalte des Biopsiematerials auf g FG bezogen, in Abhängigkeit zum histolog. geschätzten Muskelanteil.
Vergleiche Legende Abb. 9.

Werden zum Vergleich die graphisch dargestellten Metabolitgehalte pro Gramm NCN herangezogen, so ergibt sich folgendes: Mit zunehmendem Muskelfaser-Schwund steigen die Substratgehalte an (Abb. 13 und 14).

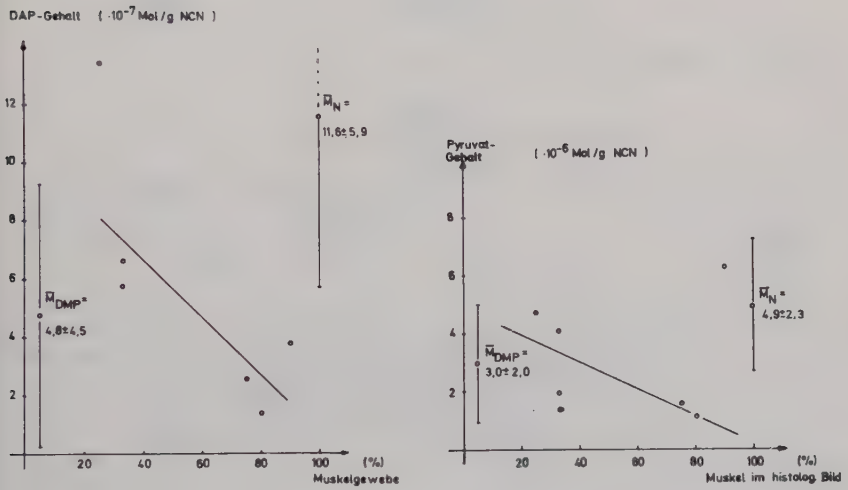
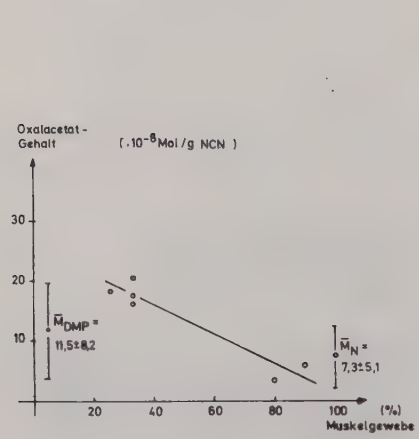


Abb. 13: DAP- und Pyr-Gehalte der Gewebsproben im Verhältnis zum histolog. geschätztem Muskelanteil, bezogen auf g NCN.
Vergleiche Legende Abb. 9.



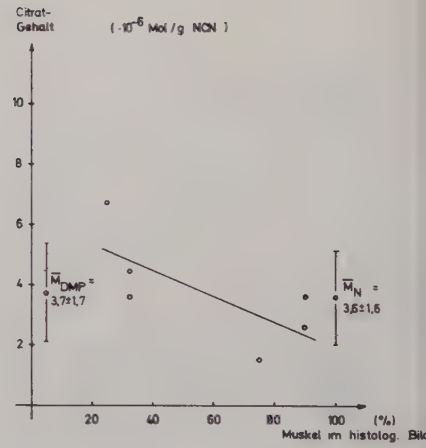


Abb. 14: OA- und Citrat-Gehalte der Gewebsproben im Verhältnis zum histolog. geschätzten Muskelanteil, bezogen auf g NCN.
Vergleiche Legende Abb. 9.

Dies kann anhand von Abbildung 15 folgendermaßen erklärt werden: Durch die Vermehrung des Bindegewebes wird der NCN-Gehalt kleiner; folglich steigen die auf NCN bezogenen Metabolit-Gehalte relativ an, wenn die Substrat-Gehalte in den Gewebsproben gleich bleiben.

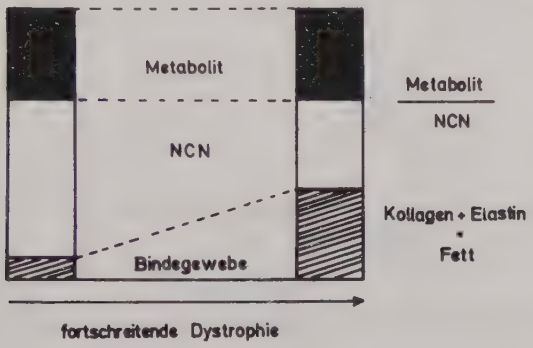


Abb. 15: Schematische Darstellung der Änderung des NCN- und BG-Anteils des Gewebes im Verlaufe der DMP.
Erläuterung im Text.

Das bedeutet jedoch, daß entweder der Metabolit-Gehalt des vikariierenden Bindegewebes ebenso groß ist wie der der untergegangenen Muskelfasern, oder aber, daß die Metabolitspiegel in der verbleibenden Muskulatur ansteigen. Dafür sprechen die Befunde Lochners über eine intensivere Glykolyse im dystrophen Hamstermuskel, ferner andere Befunde, die später erläutert werden.

In der Gruppe der energiereichen Phosphate und des Creatins können drei Gruppen unterschieden werden:

a) ADP und AMP,
b) ATP und CP,
c) Creatin

ADP und AMP erfahren, auf Gramm FG bezogen, im Verlaufe der Erkrankung praktisch einen linearen Abfall, etwa proportional dem ständigen Verlust an Muskelmaterial. Auf NCN bezogen, bleiben sie konstant oder, anders ausgedrückt, die Muskelfasern behalten ihren ADP- und AMP-Gehalt im Verlaufe der Erkrankung unverändert (Abb. 16).

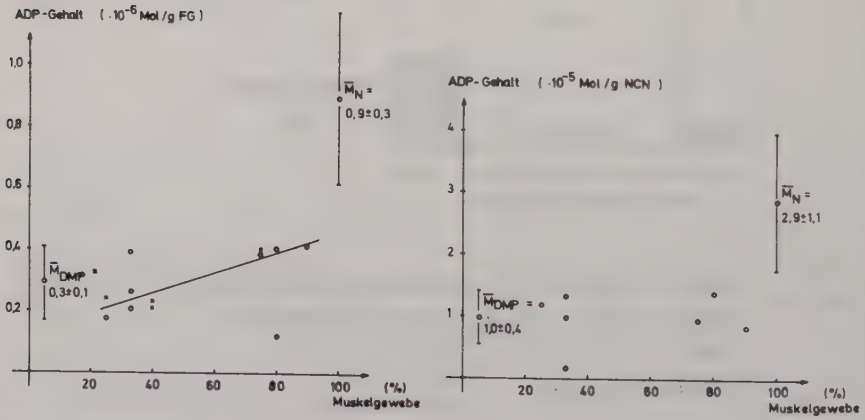


Abb. 16: Verlauf des ADP-Gehaltes im Verhältnis zum Muskelanteil der Gewebsprobe, bezogen auf g FG (links) und g NCN (rechts).

ATP und CP zeigen jedoch ein anderes Verhalten: Die auf Gramm FG bezogenen Gehalte fallen mit zunehmendem Einwachsen von Bindegewebe zunächst steil ab, um in den späten Stadien jedoch nur noch geringgradig abzusinken (Abb.17 u.18).

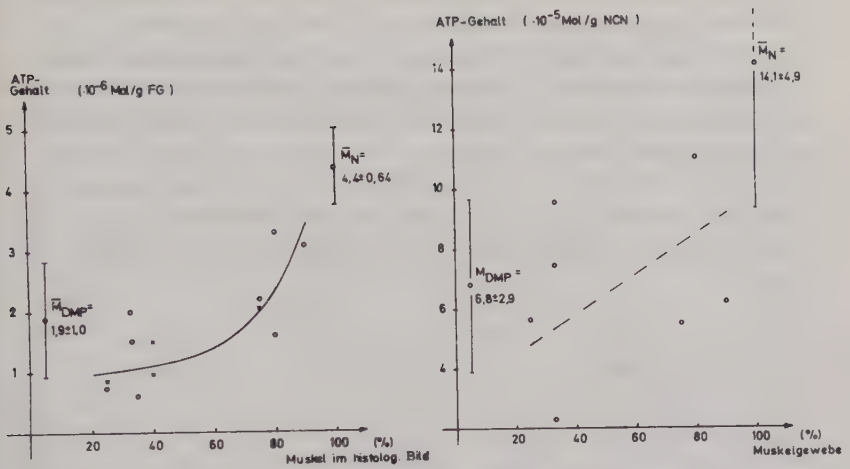


Abb. 17: ATP-Gehalte der Gewebsproben im Verhältnis zum Muskelanteil, bezogen auf g FG (links) und g NCN (rechts).

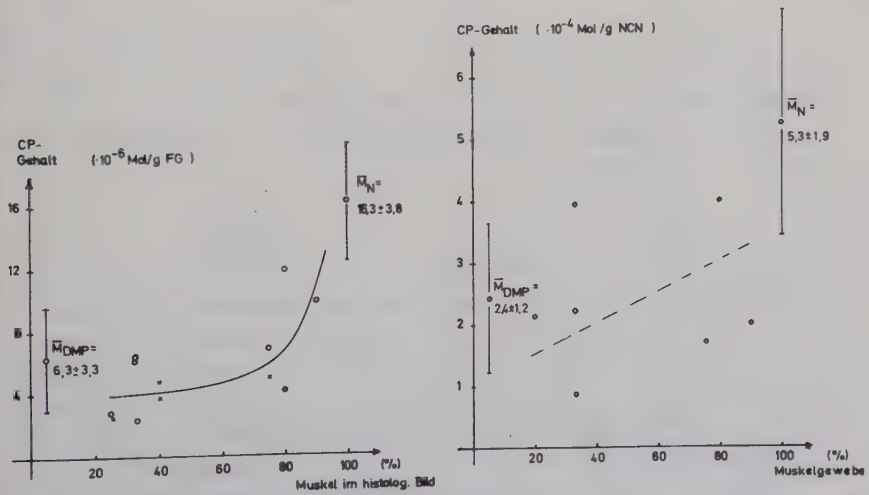


Abb. 18: CP-Gehalte der Gewebsproben im Verhältnis zum Muskelanteil, bezogen auf g FG (links) und g NCN (rechts).

Auf NCN bezogen - hier wird die Aussage wegen der großen Streubreite unsicher - scheint der Gehalt der beiden Substrate im Verlaufe der Erkrankung zu sinken, die Muskelfasern scheinen also fortlaufend ATP und CP zu verlieren.
Der im Vergleich zum ADP weitaus progredientere ATP-Abfall bewirkt, daß sich der Quotient ATP/ADP umgekehrt proportional zum Muskelfasergehalt verschiebt bzw. direkt proportional zum wachsenden BG-Anteil (Abb. 19). Dies legt den Schluß nahe, daß im Verlaufe der Erkrankung entweder die Phosphorylierung erschwert wird, oder mit dem morphologisch sichtbaren Schwund der Myofibrillen ein ATP-Speicher verloren geht.

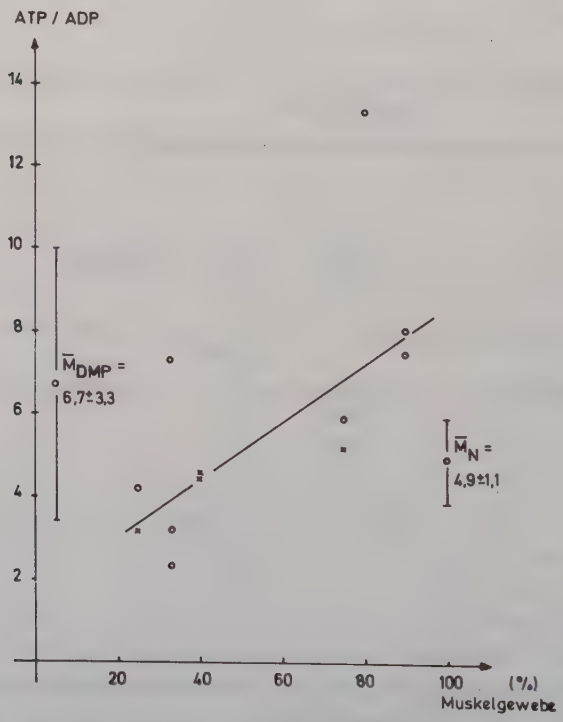


Abb. 19: ATP/ADP-Quotienten im Verlaufe des fortschreitenden Muskelverlustes der Gewebsproben. Vergleiche Legende Abb. 9.

Das Creatin ähnelt in seiner Bewegung mehr den Glykolysemetaboliten.
Zwar zeigen zwei der auf FG bezogenen Werte, die mit hohem Muskelfaseranteil im histologischen Präparat korrelieren, vergleichsweise hohe Creatingehalte; die anderen Meßwerte liegen jedoch auf gleicher Höhe (Abb. 20).

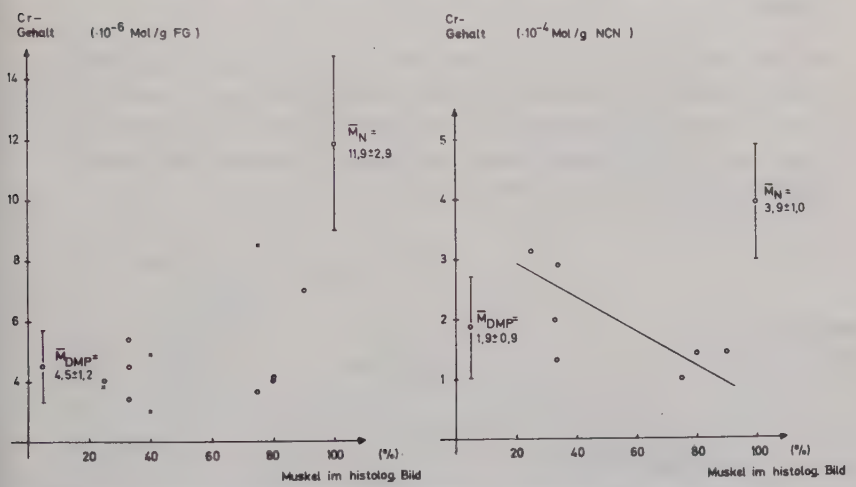


Abb. 20: Cr-Gehalte der Gewebsproben im Verhältnis zum Muskelanteil, bezogen auf g FG (links) und g NCN (rechts).

Auch der Verlauf der auf NCN bezogenen Gehalte gleicht dem der Glykolysemetabolite; sie zeigen ein relatives Ansteigen parallel zu dem sich vermehrenden Bindegewebe.
Wenn wir annehmen, daß das Creatin als wichtiges Energiestoffwechselprodukt in den Muskelfasern in sehr viel höherer Konzentration vorkommt, als in den begleitenden Bindegewebszellen, so müssen wir folgern, daß hier zwei gegensätzliche Prozesse im Gang sind: Einmal nimmt der Gehalt des Gewebes an Creatin proportional zum Untergang der Muskelfasern ab. Zum anderen scheinen die noch vorhandenen Fasern mehr Creatin

zu enthalten. Dies könnte auf eine verminderte CP-Synthese und damit auf einen Creatinstau hinweisen.

4 3 3 _ _ Enzymgehalte_

Auf FG bezogen verhält sich die 6PGDH völlig uncharakteristisch. Werden die Meßwerte auf NCN bezogen, zeigt sich im Verlauf der Erkrankung ein steiler Anstieg der 6PGDH (Abb. 21).

Offensichtlich ist die 6PGDH-Aktivität im Gewebe insgesamt nicht erhöht, wohl aber in dem Teil des Gewebes, in dem sich der Stoffwechsel abspielt. Da jedoch dieser Teil wiederum partiell aus eingewandertem Fettgewebe besteht, ist eine 6PGDH-Erhöhung zu erwarten (Siehe S.15) (31).

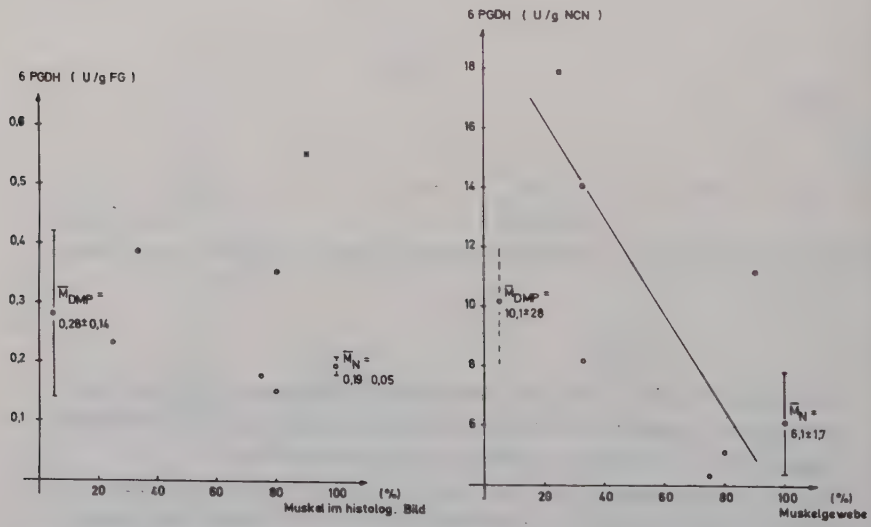


Abb. 21: 6 PGDH-Aktivitäten der einzelnen Gewebsproben im Verhältnis zur noch vorhandenen Muskulatur, bezogen auf g FG (links) und g NCN (rechts).

Die SDH-Gehalte ähneln in ihrer Bewegung dem ADP- und AMP-Verhalten. Dieses Enzym fällt also auf Gramm FG bezogen proportional zum Muskelfaserverlust, verändert sich jedoch nur wenig bei NCN als Bezugssystem (Abb. 22).

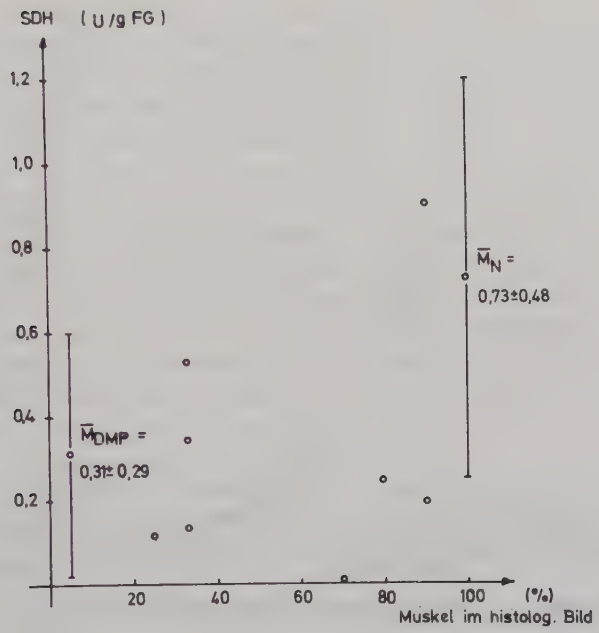


Abb. 22: SDH-Aktivitäten der Gewebsproben im Verhältnis zum histolog. geschätzten Muskelanteil, bezogen auf g FG.

Dreyfus (21) beobachtete gleiches.
Die α-GPOx fällt auch hier aus dem Rahmen: Wenn der Muskelfaseranteil noch 80 % der Gewebsmasse beträgt, ist die α-GPOx bereits auf 20 % des Normalwertes abgesunken. Die NCN-bezogenen Meßergebnisse zeigen dasselbe Ergebnis. Dies ist die einzige Meßreihe, bei der NCN- und FG-bezogene Kurven die vollständig gleiche Gestalt haben (Abb. 23).

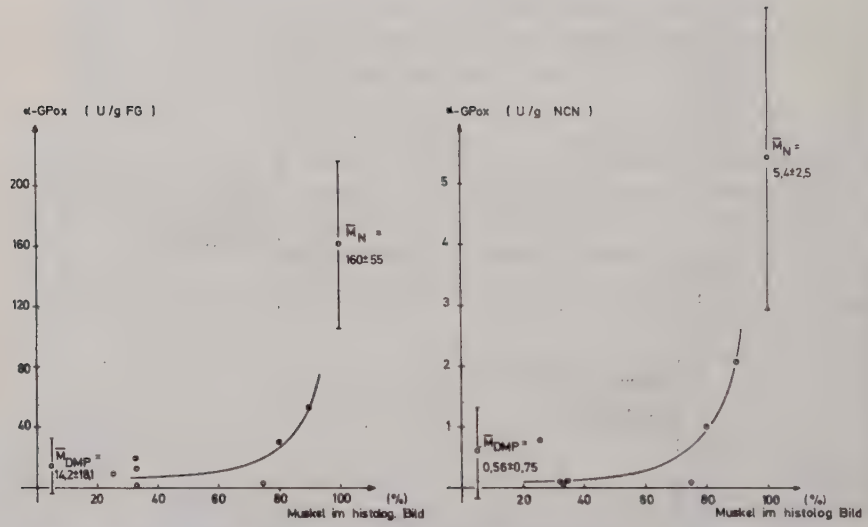


Abb. 23: α-GP Ox-Aktivitäten der Gewebsproben im Verhältnis zum Muskelanteil, bezogen auf g FG (links) und g NCN. (rechts)

4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Metabolite können in ihrem Verhalten im Verlauf der Muskeldystrophie in zwei Gruppen unterteilt werden. Einmal in die Substrate der Glykolyse und des Citratzyklus, die von dem dystrophischen Prozeß unberührt bleiben, zum anderen in die Metabolite des Energiehaushaltes, die einen zunehmenden Verlust erleiden.
Die Ergebnisse der Mittelwertsberechnungen sind nicht immer befriedigend. Fast alle Substrate sind erniedrigt, viele jedoch nicht signifikant. Die Erniedrigung ist nicht einheitlich. Der Glykogen-Gehalt ist ohne Signifikanz höher als normal, so daß fast auf einen Phosphorylasemangel geschlossen werden könnte. Die auf NCN bezogenen Metabolit-Gehalte des Citratzyklus sind teils erhöht bzw. unverändert (OA und Citrat), teils erniedrigt (Malat).
Dieser Widerspruch bleibt zunächst offen.
Für die Enzymaktivitäten jedoch ist das Ergebnis der Mittelwertsberechnung mit dem der Verlaufskurven in Abhängigkeit von der noch erhaltenen Muskulatur in Einklang zu bringen.

5 Diskussion

5 1 Metabolitgehalte bei Reizung des Muskels

Wie aus den Arbeiten von Hohorst (33) hervorgeht, sind die Metabolit-Gehalte - mit Ausnahme des ATP - außerordentlich empfindlich gegenüber Reizungen der Muskulatur. Hohorst bezeichnet ein Ansteigen der AMP, FDP- und G6P-Gehalte als Indikator für das Vorliegen eines Reizzustandes. Das gleiche gilt für Lactat, -GP, -Malat, Creatin und Pi. Umgekehrt dürfte das Ausgangssubstrat der Glykolyse, das Glykogen, im Reizzustand verstärkt abgebaut werden. Diese Annahme wird durch die Beobachtung gestützt, daß nach einem tetanischen Reiz von 5 Sekunden Dauer das Pi auf das Dreifache des Ruhewertes ansteigt. Damit wird der Glykogenstoffwechsel in Richtung des Glykogenabbaues verschoben.

5 1 1 Der Verlust von Glykolyse- und Citratzyklus-Metaboliten - ein Artefakt

Diese Befunde sind für uns aus folgendem Grunde wichtig:

Wie auf Seite 36 angedeutet, wurden die Muskelproben des Normalkollektivs anläßlich meist größerer Operationen gewonnen, bei denen biochemische Interessen hinter den chirurgisch-medizinischen zurücktraten. Infolgedessen wurde die Muskulatur nicht erst sorgfältig freipräpariert, blutende Gefäße wurden elektrokoaguliert usw.; insgesamt muß ein stärkerer Reizzustand des Gewebes angenommen werden. Andererseits konnte bei der Muskelbiopsie unserer Patienten auf die biochemischen Belange mehr Rücksicht genommen werden, so daß das Biopsiematerial in weitaus geringerem Maße gereizt war. Dieser Umstand muß konsequenterweise veränderte Substrat-Gehalte im Muskelgewebe des Normalkollektivs in oben erörterter Weise zur Folge haben.

Hierzu ein Vergleich der Metabolit-Änderung bei tetanischem Reiz mit der Substrat-"Erniedrigung" bei den DMP-Patienten:

Tabelle IX*

Substrat	Gehalt des Rattenmuskels im Ruhezustand in % des Gehaltes nach tetan. Reiz. Substratwerte im Reizzustand = 100 %	Substrat-Gehalt des Muskelgewebes der DMP-Patienten in % des Gehaltes des Normalkollektivs
Lactat	40 %	40 %
Pyruvat	60 %	60 %
α-GP	50 %	20 %
DAP	60 %	80 %

Die teilweise zahlenmäßige Übereinstimmung der beiden Metabolit-"Verluste" ist auffällig, da die Reizqualitäten in unserem Normalkollektiv unkontrolliert waren. Das stärkere "Absinken" des α-GP und Lactat gegenüber dem DAP und Pyruvat in beiden Untersuchungen und damit die Erhöhung des Lactat/Pyruvat- und α-GP/DAP-Quotienten können ein Indiz für die Ähnlichkeit der Ursachen sein. Analoges gilt sowohl für die anderen Metabolite der Glykolyse und des Citratzyklus als auch für das Creatin. Das Glykogen dürfte bei unseren Normalpersonen (da im Reizzustand verstärkt abgebaut) zu niedrig gefunden worden sein. Der Glykogengehalt der dystrophen Muskulatur ist also wahrscheinlich ebenso hoch wie in der gesunden.

Der von uns gemessene Creatin-Phosphat-Abfall hingegen dürfte in Wirklichkeit größer sein, da bei tetanischem Reiz in der Rattenmuskulatur das CP in den ersten 10 Sekunden auf 50 % abfällt. Aus Tabelle IX läßt sich annehmen, daß der Operations-Reiz bei den Normalpersonen in etwa einem 10-sec-Tetanus entsprechen könnte. Den wahren CP-Gehalt des gesunden

---

* Aus dieser Tabelle wird deutlich, daß die angeführten Substrate im Ruhezustand nur ca. die Hälfte betragen und durch den tetanischen Reiz um ca. 100 % erhöht werden.

menschlichen Muskels müßte man also um 150-200 % höher veranschlagen, als er in diesen Experimenten gemessen wurde. Das entspräche dem von Hohorst gemessenen Wert von 21×10^{-6} Mol pro Gramm FG in der Rattenmuskulatur. Nach dieser Überschlagsrechnung würde sich der wahre Verlust des dystrophen Muskels an CP auf 75 % erhöhen, der dystrophe Muskel also nur noch 25 % CP des gesunden Muskels enthalten.

Der ATP-Gehalt des Muskels ändert sich während eines Reizzustandes nur langsam im Sinne eines linearen Abfalls. Hohorst erklärt diese Beobachtung mit der Lokalisierung des ATP-Stoffwechsels in verschiedenen Kompartementen (33). Der ATP-Verlust während eines 10-sec-Tetanus beträgt etwa 10 %; der durch die mangelhafte Entnahmetechnik entstandene Fehler in unserem Normalkollektiv kann hinsichtlich des ATP also unberücksichtigt bleiben.

Der AMP- und ADP-Gehalt dürfte, ebenso wie der Creatin-Gehalt, im Normalkollektiv durch die Reizung erhöht sein und damit bei den Patienten nur scheinbar erniedrigt, da gerade das AMP rasch und deutlich auf Muskelreize reagiert (33).
Für ADP, das nur langsam reagiert, erscheint es jedoch fraglich, ob dies die einzige Deutung des Befundes darstellt.

5 1 2 Zusammenfassung der Ergebnisse unter Berücksichtigung des Reizzustandes im Normalkollektiv

1.) Die Gehalte an Metaboliten der Glykolyse und des Citratzyklus sind sehr wahrscheinlich in der dystrophen Muskelfaser ebensohoch wie in der gesunden.

2.) ADP und AMP sind pro Gramm FG vermindert, im Verhältnis zur übriggebliebenen Muskulatur jedoch möglicherweise unverändert.

3.) ATP und CP sind auf 50 % bzw. 25 % der Norm abgesunken (Auf NCN bezogen, für CP überschlagsmäßig korrigierter Wert).

4.) Creatin ist insgesamt erniedrigt, in den dystrophen Muskelfasern jedoch erhöht.

5.) Die 6-PGDH-Aktivität ist im dystrophen Gewebe erhöht, was auf den stärkeren Fettgewebsanteil zurückgeht.

6.) Die SDH ist pro Gramm FG erniedrigt, nicht jedoch bei NCN als Bezugssystem.

7.) Die α-GPOx-Aktivität ist auch bei noch weitgehend erhaltenem Muskelgewebe bereits auf ein Zehntel ihres ursprünglichen Wertes abgesunken, sowohl im Gesamtgewebe als auch im Restgewebe ohne Fett und Fasern.

5 2 Hypothesen über die Ätiologie der DMP in der Literatur und Deutung der eigenen Befunde

5 2 1 Störung der Glykolyse

Wenn auch Coleman (14, 15) eine limitierende GAPDH-Senkung annimmt, so halten andere Autoren (19, 31, 54) die bisher gefundenen Erniedrigungen der Glykolyse-Enzyme im dystrophen Muskel für zu gering, als daß sie den Stoffwechsel begrenzen könnten.

5 2 3 _ _ Proteinstoffwechsel (Enzymsynthese)

Die Berichte über einen veränderten Eiweißstoffwechsel mehren sich. Morgan (52), Sarkar (63) und Srivastava (65) beschreiben eine erhöhte DNS-/RNS-Synthese, die die Einleitung zur Proteinsynthese bildet. Sie könnte in dem bekannten Enzymverlust der Muskelfaser begründet sein, den der Organismus durch eine verstärkte Enzymsynthese zu kompensieren versucht. Weiterhin scheint die CK des Dystrophikers eine abartige Struktur zu besitzen und inaktiver zu sein (34, 60). Es erscheint jedoch zweifelhaft, hierin eine Erklärung für die in dieser Arbeit beschriebene CP-Erniedrigung und Creatin-Erhöhung der Muskelfaser zu finden. Die LDH und MDH bei der Maus wurde ebenfalls verändert gefunden, und zwar der embryonalen Struktur angenähert (13). Trotzdem ist der Lactat-, Pyruvat-, Malat- und OA-Gehalt im dystrophen Muskel normal.

5 2 3 _ _ Störung in der oxydativen Phosphorylierung

Schließlich wurde in der letzten Zeit im Zusammenhang mit der menschlichen DMP eine Störung in der oxydativen Phosphorylierung vermutet (31, 48, 66). Duma (22) stellte eine dem gesunden Muskel gegenüber mindere O_2-Aufnahme des dystrophen Muskels fest, ein Indiz für eine mangelnde Funktion der Atmungskette. Das Herz muskeldystropher Kinder verbrennt die Glucose mehr anaerob als gesunder Herzmuskel (66).

Bei den verschiedenen Dystrophie-Formen der Tiere sind schon seit längerem ähnliche Überlegungen laut geworden (37, 40). Sarkar (63) fand einen hohen Pi-Spiegel, was zum Bild einer mangelhaften Atmungskette-Phosphorylierung passen würde. Lochner (48) schließt von einem erniedrigten P/O-Quotienten im dystrophen Hamstermuskel bei normaler O_2-Aufnahme auf eine Entkopplung der Atmungskette. Es weist in die gleiche Richtung, wenn als morphologisch

erstes Zeichen im Elektronenmikroskop eine Veränderung der Mitochondrien, dem Ort der Atmungskette, nachzuweisen ist (55), die wir in unseren elektronenoptischen Aufnahmen ebenfalls ganz deutlich nachweisen konnten.

Aus diesem Blickwinkel erscheint die Beschreibung einer neuen Myopathie von langsamer Progredienz beachtenswert, bei der irregulär-strukturierte Mitochondrien gefunden wurden (35, 73). Die Atmungskette sei hier nur "teilweise" entkoppelt, da der P/O-Quotient normal, die Atmungskontrolle durch ADP jedoch aufgehoben ist.

5.3 α-GPOx-Verminderung in der dystrophen Muskulatur

Es sei nun auf die auffällig niedrigen α-GPOx-Aktivitäten in der Muskulatur der dystrophen Kinder eingegangen. Wenn der ATP-Gehalt der noch erhaltenen Muskelfasern gegen ihren α-GPOx-Gehalt aufgetragen wird (Abb. 24), so fällt auf, daß das Enzym viel früher abfällt als der Metabolit, obwohl die α-GPOx streng strukturgebunden in den Mitochondrien vorliegt (10, 11, 45) und somit erst spät den Zellen verloren gehen sollte. Möglicherweise ist dieses Faktum nur ein Ausdruck für den Mitochondrienuntergang. Dann müßte jedoch die SDH als ebenfalls mitochondrienständiges Enzym in gleicher Weise absinken, was nicht der Fall ist (Vergleiche S. 70 f).

Wir sind uns bewußt, daß die Messung dieser beiden Enzyme, von denen uns die α-GOPx nur als Indikatorenzym dienen sollte, manche methodischen Schwierigkeiten beinhaltet und daß definitive Aussagen über ihre Aktivität bei dieser Erkrankung nur mit Vorbehalt gemacht werden können. Jedoch ist der α-GPOx-Gehalt des Muskels der erkrankten Kinder so deutlich erniedrigt gegenüber dem der gesunden Personen, daß dies mit methodischen Fehlern nicht mehr erklärbar ist. Dagegen spricht auch, daß die Standardabweichung bei den Normalpersonen nur etwa 10 % des Mittelwertes beträgt.

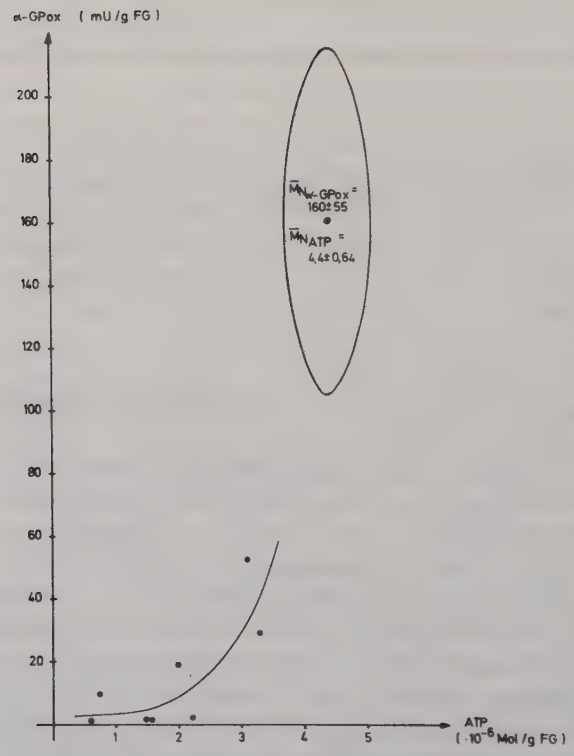


Abb. 24: α-GP-Ox-Aktivität der Gewebsproben im Verhältnis zu deren ATP-Gehalt.

5.4 Zusammenhang zwischen der α-GPOx-Erniedrigung und dem niedrigen Gehalt an energiereichen Phosphaten

Aus den Arbeiten von Bücher (10,11), Zebe (74) und Klingenberg (45) an Heuschrecken-Flugmuskeln ist bekannt, daß ein Großteil des Wasserstoff-Transfers vom Cytoplasma, dem Ort der Glykolyse, in die Mitochondrien, zur Atmungskette, über das System DAP ⟷ α-GP läuft (=Bücher-Zyklus); der Wasserstoff des α-GP wird über das Flavoproteid (45) der α-GPOx in die Atmungskette eingeschleust. Bücher und sein Arbeitskreis konnten ferner wahrscheinlich machen, daß dieser α-Glycerophosphat-Zyklus ebenfalls eine wichtige Rolle im Skelett-Muskel der Ratte spielt. Ein starker Mangel an α-GPOx könnte diesen Wasserstofftransport hemmen, womit eine mangelnde oxydative Phosphorylierung verbunden wäre. Dies bedeutet, daß nur ungenügend ATP gebildet werden kann und damit die CP-Synthese aus ATP und Creatin vermindert ist. Damit wäre der auf S. 69 beschriebene Creatin-Stau in der Muskelzelle erklärbar, ebenso das stetige Absinken des ATP/ADP-Quotienten.

Da zur Aufrechterhaltung der Membranfunktionen, die mit aktivem Transport verbunden sind, Energie aufgebracht werden muß, die vom ATP als dem "Energie-Pool" stammt, ist es vorstellbar, daß ein ATP-Mangel die Zellmembran "undicht" werden läßt.
Daß bei der oben erwähnten von v.Wiyngaarden beschriebenen Myopathie, wo die oxydative Phosphorylierung noch funktioniert, die S-CK und S-Aldolase im Serum nicht erhöht gefunden werden, spricht in diesem Sinne.

Die hier berichtete α-GPOx-Verminderung auf 10 % ist so stark, daß der H-Transport aufgrund des α-GPOx-Verlustes limitiert sein könnte.

Es ist somit zu diskutieren, ob die Ursache der Duchenne' schen Erkrankung nach dem Modell der Ein-Gen Ein-Enzym-Theorie in einem Mangel an α-GPOx liegt.

Gegen diese Hypothese läßt sich anführen, daß die Befunde über den O_2-Verbrauch des dystrophen Muskels beim Menschen nicht übereinstimmen. Falls die oxydative Phosphorylierung infolge mangelnden Wasserstoff-Angebotes in den Mitochondrien darniederliegen würde, sollte der O_2-Verbrauch in der Atmungskette vermindert sein. Dies wurde zwar von Duma (22) festgestellt, Tada (68) und Sundermeyer (66) fanden jedoch eine normale O_2-Aufnahme des Muskels. Sundermeyer beobachtete dies allerdings am Herzmuskel, der erst sehr spät Schäden zeigt. Im übrigen besitzt der Herzmuskel der Ratte eine weit geringere α-GPOx-Aktivität als der Skelettmuskel (10), so daß der Herzstoffwechsel vom α-GP-DAP-System unabhängiger ist, als der Skelettmuskel.

Ferner sollte man erwarten, daß sich bei einem α-GPOx-Mangel α-GP anhäuft. Bei den Untersuchungen dieser Arbeit konnte dies jedoch nicht gefunden werden. Möglicherweise ist das mit den oben erörterten methodischen Schwierigkeiten zu erklären; oder aber das aufgestaute α-GP wird mit Hilfe der GDH und der TIM in der Glykolyse umgesetzt. Auf diese Weise könnte auch das Ansteigen der Embden-Meyerhof-Metaboliten pro Gramm NCN verständlich werden (Siehe S. 65). Da jedoch die α-GP/DAP- und Lac/Pyr-Quotienten im Patientenkollektiv dem Normalkollektiv gegenüber kaum verändert sind, können berechtigte Einwände gegen diese Deutung der Befunde gemacht werden.

Die Diskrepanz zwischen dem starken α-GPOx-Verlust und dem vergleichsweise mäßigen SDH-Abfall kann allerdings auch in folgendem Gedanken seine Erklärung finden:
Nimmt man an, die α-GPOx habe einen wesentlich höheren turn-over als die SDH, so würden auf den Stoffwechsel der Mitochondrien einwirkende Noxen sich naturgemäß in einer

stärkeren Störung der α-GPOx manifestieren, ehe eine Verminderung der SDH-Aktivität meßbar würde.

Die Frage, ob die α-GPOx-Verminderung bei den Muskeldystrophie-Patienten eine primäre, ursächliche Erscheinung, oder sekundär durch andere Prozesse bedingt ist, sollte durch weitere Untersuchungen abgeklärt werden.

Zusammenfassung der Arbeit

1.) Es wurde der Gehalt von 17 Substraten der Glykolyse des Citratzyklus und der energiereichen Phosphate an der Muskulatur von 8 Patienten mit Dystrophia musculorum progressiva vom Typ Duchenne enzymatisch bestimmt.

2.) Zusätzlich wurden die Aktivitäten der Succinatdehydrogenase, α-Glycerin-Phosphat-Oxydase und 6-Phosphogluconsäure-Dehydrogenase im Muskel bestimmt.

3.) Es konnte gezeigt werden, daß der Gehalt an Substraten der Glykolyse und des Citrat-Zyklus unverändert ist. Die zunächst gefundene Erniedrigung konnte als Artefakt identifiziert werden.

4.) Während die Muskelfasern einen etwa unveränderten Gehalt an Adenosin-di-Phosphat und Adenosin-mono-Phosphat aufweisen, verlieren sie im Verlauf der Erkrankung fortwährend Adenosin-tri-Phosphat und Creatin-Phosphat.

5.) Der Creatin-Gehalt des noch erhaltenen Muskelgewebes erscheint höher als normal, was mit einem Anstau infolge der verminderten Creatin-Phosphat-Synthese erklärt wird.

6.) Die Succinat-Dehydrogenase ist im Gesamtgewebe vermindert, jedoch besteht kein Anhalt für einen starken Verlust in den Muskelfasern.

7.) Die 6-Phosphogluconsäure-Dehydrogenase ist im Gefolge des zunehmenden Ersatzes durch Fettgewebe vermehrt.

8.) Die α-Glycerin-Phosphat-Oxydase wurde auf 1/10 des Normalwertes erniedrigt gefunden.

9.) Als mögliche Ursache der Duchenne'schen Muskeldystrophie wird eine Störung der oxydativen Phosphorylierung diskutiert, insbesondere eine Störung des Wasserstofftransportes, deren Ursache in einer starken Verminderung der α-Glycerin-Phosphat-Oxydase liegt.

Tabelle X

Substrat-Einzelwerte in Mol/g FG der Patienten in Tab.IIIa

Substrat	Glykogen-Glucose	G6P	6PGS	FDP	DAP	α-GP	PEP	Pyr	Lac	Mal	OA	Cit	ATP	ADP	AMP	CP	Cr
Dimension	10^{-6}	10^{-6}	10^{-8}	10^{-8}	10^{-8}	10^{-8}	10^{-8}	10^{-8}	10^{-6}	10^{-8}	10^{-8}	10^{-8}	10^{-6}	10^{-6}	10^{-6}	10^{-6}	10^{-6}
Nr.v.Pat. 1a	2,25	0,06	-	1,15	1,73	6,13	1,9	6,08	2,51	1,16	0,23	8,8	0,73	0,17	0,69	2,79	4,04
2a	2,1	0,02	-	0,6	-	2,3	0,49	3,6	1,06	3,38	0,45	9,5	0,6	0,26	0,39	2,3	3,42
3a	11,7	0,16	0,08	1,4	1,0	2,5	0,25	6,3	1,7	2,7	0,25	5,6	1,5	0,2	0,15	6,1	4,5
4a	-	0,30	0,16	4,0	1,5	4,2	2,0	5,0	2,1	10,0	0,56	1,2	2,0	0,39	0,31	6,3	5,4
5a	1,6	0,06	0,62	0,84	1,02	4,6	0,9	6,3	3,47	3,62	-	5,9	2.2	0,38	0,50	6,83	3,64
6a	43,6	0,06	0,77	0,51	0,41	1,4	0,73	3,1	2,2	5,9	0,10	11,0	3,3	0,4	0,25	11,9	4,1
7a	9,7	0,15	0,44	14,6	1,5	4,8	0,99	6,5	2,04	4,0	0,24	9,7	1,6	0,12	0,37	4,0	4,8
8a	17,1	0,20	0,20	2,6	1,9	7,1	1,8	31,0	1,96	7,8	0,29	13,0	3,1	0,41	0,64	9,9	7,0
9a	5,2	0,39	-	1,07	-	34,8	12,9	590	38	29	-	-	1,6	0,72	-	5,2	5,6
10a	5,9	0,04	-	1,4	1,1	2,5	2,7	8,1	3,5	9,2	1,08	-	0,76	0,09	0,41	1,5	4,0

(Fortsetzung)

Tabelle X

Substrat	Lac/Pyr	α-GP/DAP	Mal/OA	ATP/ADP	CP/Cr	α-GPOx	SDH	6PGDH	NCN	Histologie
Nr.v.Pat. 1a	41	3,5	50	4,2	0,7	9,5mU	0,11 U	0,23 U	12,9 g	20 %
2a	30	-	8	2,4	0,7	0	0,53	0,38	26,3	33 %
3a	27	2,4	11	7,3	1,4	1,2	0,13	0,13	15,4	33 %
4a	41	2,7	18	5,2	1,2	19	0,34	-	27,3	33 %
5a	55	4,5	-	5,9	1,9	2,0	0,007	0,18	40,6	75 %
6a	70	3,3	57	8	2,9	29	0,19	0,15	29,6	80 %
7a	32	3,2	17	13,3	1,0	1,0	0,24	0,35	-	80 %
8a	6	3,8	27	7,4	1,4	52	0,9	0,55	49,4	90 %
9a	6	-	-	2,1	0,9	-	-	0,26	22,7	66 %
10a	43	2,2	9	8,4	0,4	-	-	-	24,6	75 %

Tabelle XI a

Einzelwerte in Mol/g NCN der Patienten in Tab. IIIa

Substrat	Glykogen-Glucose	G6P	6PGS	FDP	DAP	GP	PEP	Pyr	Lac	Mal	OA	Cit	ATP	ADP	AMP	CP	Cr
Dimension	10^{-5}	10^{-5}	10^{-7}	10^{-7}	10^{-7}	10^{-5}	10^{-7}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-7}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}	10^{-5}
Nr.v.Pat. 1a	17,4	0,50	-	8,9	13,4	0,50	14,7	0,47	19,5	0,90	1,79	0,68	5,6	1,34	0,54	21,6	31,3
2a	8,0	0,08	-	2,2	-	0,09	1,9	0,14	4,0	0,13	1,71	0,36	2,3	0,97	1,48	8,6	13,0
3a	76,0	1,07	0,53	8,8	6,6	0,16	1,6	0,41	10,9	0,17	1,60	0,36	9,6	1,31	0,94	39,4	29,0
4a	-	1,17	0,57	13,2	5,8	0,15	7,7	0,19	7,8	0,37	2,03	0,45	7,5	0,14	1,12	23,1	19,8
5a	3,9	0,14	1,5	2,1	2,5	0,11	2,2	0,16	8,5	0,09	-	0,15	5,5	0,93	1,22	16,8	8,9
6a	147,3	0,20	2,6	1,7	1,4	0,05	2,5	0,11	7,4	0,20	0,35	0,36	11,0	1,38	0,86	40,2	14,0
7a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8a	34,6	0,39	0,40	5,2	3,8	0,14	3,7	0,63	4,0	0,16	0,59	0,26	6,2	0,83	1,30	20,0	14,2
9a	22,9	1,79	-	4,7	-	1,53	56,8	25,99	167,4	0,01	-	-	6,8	3,19	-	23,1	24,8
10a	24,0	0,14	-	5,7	4,4	-	11,0	0,33	14,2	0,37	4,39	-	3,1	0,36	1,64	6,1	16,4

Tabelle XI b

Enzym-Einzelwerte der Patienten in Tab. III a

(U/g NCN)

Enzym / Nr.d.Patienten	α-GPOx	SDH	6 PGDH
1a	0,74	8,5	17,8
2a	0	20,4	14,1
3a	0,08	8,4	8,2
4a	0,07	12,5	-
5a	0,05	0,2	4,3
6a	0,98	6,4	5,1
7a	-	-	-
8a	2,02	18,8	11,1
9a	-	-	11,5
10a	-	-	-

Tabelle XII

Substrat-Einzelwerte in Mol/g FG der Patienten in Tab. III b

Substrat	G6P	FDP	DAP	α-GP	PEP	Pyr	Lac	Mal	OA	ATP	ADP	AMP	CP	Cr
Dimension	10^{-6}	10^{-8}	10^{-8}	10^{-8}	10^{-8}	10^{-8}	10^{-6}	10^{-8}	10^{-8}	10^{-6}	10^{-6}	10^{-6}	10^{-6}	10^{-6}
Nr.d.Patienten														
1b	-	2,3	1,7	10,0	-	3,5	1,13	2,7	0,17	0,76	0,24	0,15	2,5	3,9
2b	0,06	1,1	0,8	2,4	0,77	5,1	1,05	1,5	0,23	1,53	0,23	0,13	4,8	5,0
3b	-	1,8	1,1	-	-	3,2	7,12	-	0,27	0,95	0,21	0,46	3,6	3,0
4b	-	21,5	5,3	10,2	-	5,6	1,4	5,6	0,31	2,09	0,40	0,38	5,1	8,5
5b	0,18	5,8	1,7	8,1	1,02	2,3	7,7	5,2	0,10	2,41	0,32	0,16	7,2	8,8

	Lac/Pyr	α-GP/DAP	Mal/OA	ATP/ADP	CP/Cr	Histologie
1b	32	6,4	16	3,2	0,65	25 %
2b	21	3,0	7	6,6	0,96	40 %
3b	220	-	-	4,5	1,17	40 %
4b	26	1,9	18	5,2	0,59	40 %
5b	33	4,8	53	7,4	0,82	-

Literatur-Verzeichnis

(1) Bajusz, E.; Jasmin, G.: Studies on the activity and distribution of oxidative and hydrolytical enzymes in the skeletal and cardial muscle of dystrophic mice.
Rev.canad.biol.21, 409, (1962)

(2) Baker, H.; Huebotter, R.: Glucose metabolism and bicarbonate turnover in dystrophic mice.
Am.J.physiol.207, 1161, (1964)

(3) Barthelmai, W.: Über den Einfluß von Corticoidgaben auf die Creatinphosphokinase bei progressiver Muskeldystrophie.
Verhandlungen Deutsche Gesellschaft innere Medizin 71, 624, (1965)

(4) Beard, H.H.; Barnes, B.: The influence of feeding proteins, amino acids and related substances upon creatine-creatinine-metabolism.
J.biol.chem.94, 49, (1931)

(5) Benedict, J.D.; Kalinsky, H.J.et.al.: The origin of urinary creatine in progressive muscular dystrophy.
J.clin.investigation.34, 141, (1955)

(6) Bergmeyer, H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse, Verlag Chemie, Weinheim 1962.

(7) Blietz, R.J.; Paulmann, F.: Glucose-Assimilation und Insulinwirkung bei x-chromosomaler, rezessiv erblicher Muskeldystrophie (Typ Duchenne)im Belastungstest.
Hoppe-Seyler'sche Z.f.physiol.Chemie,347,35,(1966)

(8) Bonetti, E.; Toschi, N.; Levi, M.: Le Frazioni del Fosforo Acido-solubile nella Distrofia muscolare progressiva.
Sperimentale 104, 315,(1954)

(9) Bourdakos, N.; Wolf, St.: Creatine and muscular dystrophy.
Arch.neurol.6, 439, (1962)

(10) Bücher, Th.:Redoxbeziehungen des -Glycerophosphat.
Sitzungsberichte Gesellschaft Beförderung Naturwissenschaften Marburg, 83/84,383,(1961/62)

(11) Bücher, Th.; Klingenberg, M.: Wege des Wasserstoffs in der lebendigen Organisation.
Angewandte Chemie 70, 552, (1958)

(12) Canal, N.; Frattola, L.: Studies on the "pentose phosphate pathway" in hereditary muscular dystrophy in mice.
Medicina experimentalis 7, 27, (1962)

(13) Cao, A.; Macciotta, A. et al.: Chromatographic electrophoretic pattern of LDH and MDH in normal human adult and foetal muscle and in muscle of patients affected by Duchenne muscular dystrophy.
Enzym.biol.clin. 7, 156,(1966)

(14) Coleman, D.L.: Studies on the acetoacetate-like compound found in dystrophic mouse muscle homogenates.
Arch.biochem.biophys. 111,489,(1965)

(15) Coleman, D.L.: Accumulation of triose-phosphates in dystrophic mouse muscle homogenates.
Arch.biochem.biophys.111,494,(1965)

(16) Collazo, J.A.;Barbudo, J.; Torres, I.: Der Chemismus des Muskels bei Dystrophia musculorum progressiva.
Deutsche medizin.Wochenschrift 62, 51,(1936)

(17) Debré, R.; Marie, J.; Nachmansohn, D.: Étude chimique du muscle prélevé par biopsie dans la myopathie.
C.R.hebdomadaires des séances de l'Academie des sciences. 202, 520,(1936)

(18) Delbrück, A.: Untersuchungen über Enzyme des Energiestoffwechsels im Bindegewebe.
Klin.Wochenschrift, 40, 677,(1962)

(19) Di Mauro,S.; Angelini, C.; Catani, Cl.: Enzymes of the glycogen cycle and glycolysis in various human neuromuscular disorders.
J.neurol.neurosurg.psychiatr. 30, 411,(1967)

(20) Dreyfus, J.Cl.; Schapira, F.: Biochemical study of muscle in progressive muscular dystrophy.
J.clin.investigation 33, 794(1954)

(21) Dreyfus, J.Cl.; Schapira,G.; Schapira,F.; Démos,J.:
Activités enzymatiques du muscle humain.
Clin.chim.acta 1, 434,(1956)

(22) Duma, D. et al:Variatjile glicogenuli, potasiului, azotului total si restant. Consomul de oxigen cu substrat endogen si exogen.
Studii si cercetări de Neurologie 12, 85,(1967)

(23) Erbslöh, F.; Klärner, P.: Vergleichende Untersuchungen bei chronischen Myopathien.
Klin.Wochenschrift 31, 1059,(1953)

(24) Fink, K.: Biochemical studies of skeletal muscle in mice with hereditary dystrophy.
Feder.proc. 20, 303a,(1961)

(25) Fitch, C.D.; Sinton, D.W.: Creatine metabolism and muscle wasting.
J.clin.investigation. 43, 444,(1964)

(26) Fitch, C.D.; Oates, J.D.; Dinning, J.S.: The metabolism of creatine-1-C^{14} by mice with hereditary muscular dystrophy.
J.clin.investigation 40, 850,(1961)

(27) Garcia-Buñuel, L.; Garcia-Buñuel, V.M.: Connective tissue and the pentose phosphate pathway in normal and denervated muscle.
Nature 213, 913, (1967)

(28) Gollarz, M.N.; Bourne, G.H.: The histochemistry of muscular dystrophy.
in: Bourne/Gollarz: Muscular dystrophy in man and animals.Verlag:S.Karger,Basel-New York, 1963.

(29) Herschberg, A.D.; Coirault,R.; Giboudeau,J.: Le métabolisme du glucose dans la myopathie progressive de Duchenne.
Annales d'Endocrinologie 25, 447, (1964)

(30) Hess, J.W.: Phosphorylase activity and glycogen, glucose-6-phosphate and lactic acid content of human skeletal muscle in various myopathies.
J.labor.clin.med. 66, 452, (1965)

(31) Heyck, H.; Laudahn, G.; Lüders, Cl.-J.: Enzymaktivitätsveränderungen im Muskel bei Dystrophia musculorum progressiva/Klin.Wochenschrift 41, 500,(1963)

(32) Hoagland, C.L.; Gilder, H.; Shank, R.E.: The synthesis, storage, and excretion of creatine, creatinine, and glycocyamine in progressive muscular dystrophy and the effect of certain hormones on these processes.
J.exp.med. 81, 423, (1945)

(33) Hohorst, H.J.:Metabolitgehalte und Metabolitgleichgewichte in der quergestreiften Muskulatur der Ratte.
Habilitationsschrift, Marburg 1962.

(34) Hooton, B.T.; Watts, D.C.: Adenosins-5-triphosphate-creatine-phosphotransferase from dystrophic mouse skeletal muscle.
Biochem.J. 100, 637,(1966)

(35) Hulsmann, W.C.; et al: Myopathy with abnormal structure and function of muscle mitochondria.
J.neurol.neurosurg.psychiat. 30, 519, (1967)

(36) Hultman, E.: Muscle glycogen in man determined in needle biopsy specimens.
Scand.J.clin.lab.investigation 19, 209, (1967)

(37) Hummel, J.P.: Oxidative phosphorylation processes in nutritional processes.
J.biol.chem. 172, 421, (1948)

(38) Humoller, F.L.; Griswold, B.; McIntyre, A.R.: Comparative chemical studies in skeletal muscle following neurotomy and tenotomy.
Am.J.physiol. 161, 406, (1950)

(39) Humoller, F.L., Griswold, B.; McIntyre, A.R.: Effect of neurotomy on succinic dehydrogenase activity.
Am.J.physiol. 164, 742,(1951)

(40) Humoller, F.L.; Griswold, B.; McIntyre, A.R.: Effect of neurotomy on hexokinase and phosphorylase activities of rat muscle.
Am.J.physiol. 167, 656, (1951)

(41) Ionăsescu, V.; Luca, N.: Investigations on carbohydrate metabolism in progressive muscular dystrophy.
Psychiat.neurol.(Basel) 146, 309, (1963)

(42) Kadenbach, B.: Der Einfluß von Thyreoidhormon in vivo auf die oxydative Phosphorylierung und Enzymaktivitäten in Mitochondrien.
Biochem.Z. 344, 49, (1966)

(43) Kandutsch, A.A.; Russell, A.E.: Creatine and creatinine in tissues and urine of mice with hereditary muscular dystrophy.
Am.J.physiol. 194, 553, (1958)

(44) Kleine, T.O.; Chlond, H.: Die Aktivität der Myokinase (Adenylatkinase) und der Creatinkinase im Serum und Muskel bei der progressiven Muskeldystrophie (Erb).
Klin.Wochenschrift 44, 103, (1966)

(45) Klingenberg, M.; Bücher, Th.: Glycerin-1-P und Flugmuskel-Mitochondrien.
Biochem.Z. 334, 1, (1961)

(46) Levène, P.A.; Kriszteller, L.: Am.J.physiol. 24, 45, (1909)

(47) Lilienthal, J.L.; Zierler, K.L.; Folk, B.P. et al:
A reference base and system for analysis of muscle constituents.
J.biol.chem. 182, 501, (1950)

(48) Lochner, A.; Brink, A.J.: Oxidative phosphorylation and glycolysis in the hereditary muscular dystrophy of the syrian hamster.
Clin.sci, 33, 409, (1967)

(49) McCaman, M.W.: Enzyme studies of skeletal muscle in mice with hereditary muscular dystrophy.
Am.J.physiol. 205, 897, (1963)

(50) McCrudden, R.H.; Sergent, C.S.: Arch.intern.med.17,465(1916)

(51) Meldolesi, G.: Pathologie und Therapie der progressiven Muskeldystrophie.
Deutsche med.Wochenschrift 63, 1654, (1937)

(52) Morgan, F.; Herrmann, H.: Comparison of muscle tissue from normal chick at different stages of development.
Proc.soc.exp.biol.med.120, 68, (1965)

(53) Nevin, S.: A study of the muscle chemistry in myasthenia gravis, pseudohypertrophic dystrophy and myotonia. Brain 57, 239, (1934)

(54) Niebrój-Dobosz, I.: Disturbances of the conbustion processes in muscular disorders.
J.neurol.neurosurg.psychiat. 28, 19, (1965)

(55) Pearce, G.W.: Electron microscopy in the study of muscular dystrophy, in: Bourne/Gollarz: Muscular dystrophy in man and animals.
Verlag:S.Karger, Basel-New-York, 1963.

(56) Rappaport, F.; Eichhorn: Micro-estimation of non-protein nitrogen in serum, plasma or blood.
Lancet 253, 17, (1947)

(57) Reinhold, J.G.; Kingsley, G.R.: The chemical composition of volontary muscle in muscle disease.
J.clin.investigation 17, 377, (1938)

(58) Roche, M.; Benedict, J.D.et al: Origin of urinary creatine in progressive muscular dystrophy.
Metabolism 1, 13, (1952)

(59) Ronzoni, E.; Berg, L.; Landau, W.: Enzyme studies in progressive muscular dystrophy.
in: Neuromuscular disorders (Proc.ass.res. nerv.mental diseases 38, 721, (1960)

(60) Ronzoni, E.; Wald, St. et al: Distribution of high energy phosphate in normal and dystrophic muscle.
Neurology (Minneapolis) 8, 359, (1958)

(61) Rosalki, S.B.: Creatine phosphokinase isoenzymes.
Nature, 207, 414, (1965)

(62) Rotthauwe, H.W.; Kowalewski, S.: Klinische und biochemische Untersuchungen bei Myopathien.
Klin.Wochenschrift 43, 145, (1965)

(63) Sarkar, N.K.; Srivastava, U.: Biochemical changes in progressive muscular dystrophy II.
J.nutrition 83, 193, (1964)

(64) Schapira, G.; Dreyfus, J.Cl. et al: Glycogenolytic enzymes in human progressive muscular dystrophy.
Am.J.phys.med. 34, 313, (1955)

(65) Srivastava, U.; Devi, A.; Sarkar, N.K.: Biochemical changes in progressive muscular dystrophy III.
J.nutrition 86, 298, (1965)

(66) Sundermeyer, J.F.; Gudbjarnason, S. et al: Myocardial metabolism in progressive muscular dystrophy. Circulation 24, 1348, (1961)

(67) Tada, K.; Watanabe, Y.; Chikaoka, H.: Demonstration of defect of creatine phosphokinase in muscle of progressive muscular dystrophy. Tohuku J.exp.med. 75, 296, (1961)

(68) Tada, K.; Hirono, H.; Miyazawa, H.: Oxygen consumption and anaerobic glycolysis of the muscle from the patients with progressive muscular dystrophy. Tohuku J.exp.med. 79, 135, (1963)

(69) Taussky, H.H.; Washington, A. et al: Citric acid in tissues of normal and dystrophic animals. Nature 196, 1100, (1962)

(70) Tyler; Perkoff: Studies in disorders of muscle. Arch.intern.med. 88, 175, (1951)

(71) Vignos, P.J.; Lefkowitz, J.M.: A biochemical study of certain skeletal muscle constituents in human progressive muscular dystrophy. J.clin.investigation 38, 872, (1959)

(72) Vignos, P.J.; Warner, J.L.: Glycogen, creatine and high energy phosphate in human muscle disease. J.lab.clin.med. 62, 579, (1963)

(73) v.Wijngaarden, G.K.; Bethlem, J. et al: Skeletal muscle disease with abnormal mitochondria. Brain 90, 577, (1967)

(74) Zebe, E.; Delbrück, A.; Bücher, Th.: Über den Glycerin-1-P-Cyklus im Flugmuskel von Locusta migratoria. Biochem. Z. 331, 254, (1959)

(75) Zierler, K.L.: Aldolase leak from muscle of mice with hereditary muscular dystrophy . Bull. Johns Hopkins Hosp. 102, 17, (1968)

Mein Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. F. Linneweh, für die Überlassung des Themas, der Patienten und die Bereitstellung der notwendigen Apparaturen.

Besonders danken möchte ich ferner Herrn Dr. med. W. Barthelmai für seine wertvollen Ratschläge und seine jederzeit geduldige und tatkräftige Unterstützung;

ebenso Herrn Prof. Dr. Dr. H.J. Hohorst, der in seinem Laboratorium vor einigen Jahren die ersten derartigen Untersuchungen an 5 Patienten unserer Klinik durchführte und uns die Ergebnisse zur Verfügung stellte, sowie mich in die biochemischen Methoden einführte;

weiterhin Herrn Dr. med. Körner und Herrn Oberarzt Dr. med. Bartsch von der Chirurgischen Universitätsklinik, die in zuvorkommender Weise die Probeexzisionen an unseren Kindern durchführten;

Herrn Dr. med. Solcher, der freundlicherweise die histologische Beurteilung des Biopsiematerials besorgte.

Herrn Prof. Dr. phil. Vogell möchte ich für seine elektronenmikroskopischen Befunde ebenfalls danken.

Lebenslauf

Am 21. Februar 1942 wurde ich als viertes Kind des Regierungsrates Dr.med.Lothar Stengel-v.Rutkowski und seiner Frau Monika geb. Hoppe, in Jena/Thüringen geboren.
Von Herbst 1948 bis Sommer 1949 besuchte ich die Nordschule in Marburg, von 1949 bis 1952 die Volksschule in Marktheidenfeld/Unterfranken. Nach Besuch der unteren sechs Klassen des humanistischen Gymnasiums in Miltenberg/Main wechselte ich auf das Wirsberg-Gymnasium in Würzburg über, wo ich im Juli 1961 das Abitur ablegte.
Nach Ableistung meines Wehrdienstes begann ich in Marburg im Mai 1963 das Studium der Medizin. Im Februar 1964 bestand ich dort das Vorphysikum und im Oktober 1965 das Physikum. Nach einem Semester an der Medizinischen Akademie in Lübeck im Sommer 1966 kehrte ich nach Marburg zurück und schloß dort das Studium im Juli 1969 mit dem Staatsexamen ab.
Ab September 1969 arbeite ich an der Universitäts-Kinderklinik in Marburg.
Der experimentelle Teil für die eingereichte Dissertation wurde vom Frühjahr 1967 bis Sommer 1968 ebenfalls an der Universitäts-Kinderklinik in Marburg durchgeführt.

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten

in Marburg: Beckmann, Berendes, Bommer, Braun-Falco, Brück, Buchholz, Dimroth, Dittrich, Dölle, Drawert, Exner, Gedigk, Golenhofen, Grebe, Hamm, Harbauer, Hardewig, Hensel, Herrmann, Hess, Hettler, Hildebrandt, Hohorst, Jacob, Karlson, Kessel, Klingenberg, Knauff, Linneweh, Löhr, Lübbers, Mahr, Mann, Martini, Marx, Mattes, Petry, Rodeck, Rodenhäuser, Rohen, Salfeld, Schiff, Schirren, Schleyer, Schlosser, Schmid, Schrappe, Schwaiger, Seidel, Siegert, Sieß, Spiegelberg, Staib, Straub, Streicher, Strohmeyer, Stutte, Teller, Vogell, Vogt, Walcher Würterle;

in Lübeck: Eichler, Griesser, Hahn, Hansen, Hörder, Jeckeln, Preuner, Remé, Ritter, Schmidt, Sieber, Uthgenannt, Wegener, Zetler.